



**Mirjam Assmann**

---

**Konventionelle und molekulare Analysen von  
Trachealsekret, Mekonium und Stuhl zur ergänzenden  
Sepsisdiagnostik von Frühgeborenen unter  
Anwendung der PCR/DHPLC (WAVE®)**

**Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Konventionelle und molekulare Analysen von  
Trachealsekret, Mekonium und Stuhl zur ergänzenden  
Sepsisdiagnostik von Frühgeborenen unter Anwendung  
der PCR/DHPLC (WAVE<sup>©</sup>)**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Mirjam Assmann**

aus Herborn

Gießen 2014

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Justus-Liebig-Universität Gießen,

Leiter Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter: Professor Dr. rer. nat. E. Domann

Gutachter: Professor Dr. med. K.P. Zimmer

Tag der Disputation: 03.12.2014

meinen Eltern  
Volkmar und Renate Assmann

## Inhaltsverzeichnis

1. Erklärung laborspezifischer Begriffe .....	1
2. Einleitung .....	4
2.1 Definition und Epidemiologie der Frühgeburt .....	4
2.2 Problematik Frühgeborener .....	5
2.3 Infektionen als Ursache einer Frühgeburt .....	7
2.4 Bakterielle Besiedelung von Darmtrakt und unteren Atemwegen bei Frühgeborenen.....	12
2.5 Sepsis des Frühgeborenen .....	15
2.6 16S-rDNA Approach zur Diagnostik der konnatalen Sepsis, kulturnegativer Proben und polymikrobieller Gemeinschaften.....	17
2.7 Zielsetzung .....	20
3. Materialien und Methoden .....	22
3.1 Untersuchungen am Menschen .....	22
3.2 Beschreibung des Patientenkollektivs .....	22
3.3 Materialien und Geräte.....	25
3.3.1 Kulturmedien.....	25
3.3.2 Biochemische Identifikation .....	26
3.3.3 Identifikation durch Resistenzbestimmung.....	26
3.3.4 DNA-Extraktionsmethoden.....	27
3.3.5 Materialien für die Durchführung der PCR.....	28
3.3.6 Agarose-Gel und Gelelektrophorese .....	29
3.3.7 DNA-Aufreinigung und Sequenzierung.....	30
3.3.8 Überblick über die verwendeten Chemikalien und Geräte .....	30
3.4 Methoden.....	31
3.4.1 Probengewinnung.....	31
3.4.2 Verarbeitung der Proben .....	32

3.4.3 Molekulare Identifikation.....	34
3.4.4 Klonierung.....	35
3.4.5 PCR/DHPLC .....	36
3.5 Extraktion von DNA aus Mekonium .....	39
3.6 Standardkurven für PCR/DHPLC mit konventioneller PCR und Piko <sup>®</sup> Thermal Cycler .....	39
3.7 Statistische Methoden .....	39
4. Ergebnisse .....	40
4.1 Extraktion von DNA aus Mekonium .....	40
4.2 Untersuchung von Trachealsekret.....	41
4.3 Untersuchung von Mekonium.....	45
4.3.1 Wachstum auf Agarplatten.....	45
4.3.2 Analyse von Mekonium durch PCR und PCR/DHPLC.....	46
4.3.3 Mikrobiom aus Mekonium der Frühgeborenen .....	51
4.4 Untersuchung von Stuhl .....	52
4.4.1 Analyse des Bakterienwachstums auf den Kontrollplatten.....	52
4.4.2 Analyse von Stuhl mit PCR und DHPLC .....	56
4.4.4 Analyse aus Bakterienkulturen von Schaedleragar .....	62
4.5 Zusammenhang zwischen Sepsis bzw. Ursachen der Frühgeburt und Ergebnissen aus Mekonium, Trachealsekret und Stuhl .....	64
4.5.1 Ergebnisse aus Mekonium und Trachealsekret und deren Zusammenhänge mit konnataler Sepsis und Frühgeburtlichkeit.....	64
4.5.2 Ergebnisse aus der Untersuchung von Stuhl und Zusammenhänge mit späteinsetzender Sepsis .....	67
5. Diskussion .....	69
6. Zusammenfassung und Ausblick .....	94
7. Summary .....	97
8. Liste der verwendeten Abkürzungen.....	100

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	102
10. Literaturverzeichnis.....	104
11. Anhang .....	115
12. Erklärung zur Dissertation .....	116
13. Danksagung.....	117
14. Lebenslauf .....	118



## 1. Erklärung laborspezifischer Begriffe

In medizinischen und naturwissenschaftlichen Labors haben sich im Alltag die folgenden, zu einem großen Teil der englischen Sprache entstammenden Begriffe etabliert. Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit werden sie vorab näher erläutert.

Approach	Ansatz, Vorgehen
Amplifikat	durch PCR vervielfältigtes DNA-Fragment
blasten	DNA-Sequenzen werden in einer DNA-Datenbank im Internet abgeglichen, um sie einer Bakteriengattung oder -spezies zuordnen zu können
Bench	Durch eine Glasscheibe und eine Abzugsvorrichtung geschützter Laborarbeitsplatz, durch den steriles Arbeiten oder die Verwendung von gesundheitsschädlichen Substanzen vereinfacht wird.
Chromatographie	Separationsverfahren, bei der eine mobile Phase (hier: Flüssigkeit) und eine stationäre Phase (hier: Feststoff) eingesetzt werden. Die Auftrennung erfolgt durch das unterschiedlich starke Bindungsverhalten der zu analysierenden Substanzen an der stationären Phase bei der Eluierung durch die mobile Phase.
(DNA-)Aufreinigung	Reinigen der DNA nach der PCR, wobei überschüssige Polymerasen, Nukleotide und Primer entfernt werden.
(DNA-)Extraktion	Auflösen der bakteriellen Zellwände, um die DNA freizusetzen.

(DNA-)Marker	Substanz, mit der DNA-Fragmente vor der Gelelektrophorese so markiert werden können, dass sie z.B. unter UV-Licht sichtbar werden.
(DNA-)Sequenzierung	Aufschlüsselung der Basenabfolge der DNA
eluieren	Auswaschen, z.B. DNA von einer Chromatographiesäule mit Hilfe eines Puffers.
Gelelektrophorese	Auftrennen der DNA-Fragmente nach ihrer Länge mit Hilfe eines Stromfeldes und eines Agarosegels in Pufferlösung.
Mastermix	Gemisch verschiedener Substanzen, die für die Vervielfältigung von DNA benötigt werden, beinhaltet u.a. Nukleotide, ein Primerpaar und Polymerase.
Mikrotiterplatte	Kunststoffplatte mit 96 halbkugelförmigen oder spitzen Vertiefungen
Nukleotide	eigentlich Desoxyribonukleotide, Bausteine der DNA
PCR	Polymerase chain reaction, Methode mit Temperaturzyklen zur Vervielfältigung von DNA, bei der der Doppelstrang aufgetrennt und u.a. mit Hilfe eines Enzyms, eines Primerpaares und Nukleotiden komplementäre Einzelstränge aufgebaut werden.
Peak	Positives oder negatives Signal in der Chromatographie, das sich als Spitze oder Kurve in einem Diagramm darstellt.

Polymerase	Enzym, das während der PCR an der aufgetrennten DNA unter Verwendung freier Nukleotide einen komplementären Einzelstrang synthetisiert.
Primer	Oligonukleotid, d.h. kurze Nukleotidsequenz, die an einer hochkonservierten Region der DNA bindet. Bei der PCR wird ein Primerpaar verwendet, das die zu vervielfältigende Zielregion einrahmt und damit festlegt.
Vial	Eine von 96 halbkugeligen oder spitzen Vertiefungen in einer Kunststoffplatte.
Vortex	Gerät, bei dem Proben durch Vibration durchmischt werden.
Well	Vertiefung in einer Mikrotiterplatte
Zentrifuge	Gerät, in dem Proben einer sehr schnellen Rotationsbewegung ausgesetzt und dadurch mittels Fliehkraft nach ihrer Dichte aufgetrennt werden

## 2. Einleitung

### 2.1 Definition und Epidemiologie der Frühgeburt

Ein reifes Neugeborenes wird nach einer Tragzeit von 37 bis 41 Schwangerschaftswochen geboren, eine Frühgeburt wird demzufolge als eine Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (Schwangerschaftsdauer <260 Tagen) definiert.

Nimmt man die Schwangerschaftsdauer als Bezugsgröße, handelt es sich bei 9% der Geburten in Deutschland um Frühgeburten vor 37+0 Schwangerschaftswochen. Die Häufigkeit von sehr kleinen Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von <1500g und einem Gestationsalter von <32 vollendeten Gestationswochen beträgt etwa 1,4% <sup>(14)</sup>. Insgesamt hat die Rate an Frühgeborenen <1000g zugenommen, z.B. gemäß der Perinatalerhebung in Hessen von 2,6/1000 Lebendgeborenen 1990 auf 4,6 im Jahr 2000. Diese Zahl ist mit 4,5/1000 bis 2008 relativ konstant geblieben. Der Anstieg ist vor allem bedingt durch die Zunahme von Mehrlingsschwangerschaften im Rahmen der Reproduktionsmedizin – z.B. in Hessen von 1990 bis 2000 um 24,4% und von 2000 bis 2008 um weitere 17% <sup>(82,83)</sup>.

Die zeitliche Grenze, ab der heute ein Überleben von Frühgeborenen möglich ist, liegt etwa in der 23. Schwangerschaftswoche <sup>(60)</sup>. Limitierend für das Überleben zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung ist die Tatsache, dass sich erst etwa ab der 24. Schwangerschaftswoche die Alveolen der Lungen bilden, ohne die eine Sauerstoffaufnahme nicht möglich ist <sup>(64)</sup>.

Die Mortalität der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 500g liegt bei ca. 42%, von 500g bis 750g bei etwa 39%, bei einem Geburtsgewicht von 1000g bis 1499g noch bei 7,6% <sup>(14)</sup>, wobei weibliche Neugeborene und Einlinge generell eine bessere Überlebenschance haben. Die Überlebensrate hat sich seit den frühen Siebzigern des letzten Jahrhunderts mehr als verdoppelt, wobei die gute Betreuung von Risikoschwangerschaften und die Fortschritte in der neonatalen Intensivmedizin eine große Rolle spielen, vor allem die Entwicklung des industriell hergestellten Surfactant <sup>(51)</sup>.

Gemäß den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin wird in der Regel vor Vollendung der 22. Schwangerschaftswoche auf

eine initiale Reanimation verzichtet, da diese Kinder nur in Ausnahmefällen überleben. Die Überlebenschance steigt zwar in der 22. und 23. Schwangerschaftswoche auf bis zu 50% an, es ist jedoch in 20-30% mit schwerwiegenden Schäden mit lebenslanger Hilfsbedürftigkeit zu rechnen, so dass die Entscheidung über das Vorgehen gemeinsam zwischen Arzt und Eltern getroffen wird. Bei einer Frühgeburt in der 24. Schwangerschaftswoche lag die Überlebenschance des Kindes zwischen 2002 und 2004 in Deutschland bei 60%, so dass zu diesem Zeitpunkt grundsätzlich versucht werden sollte, das Leben des Frühgeborenen zu erhalten <sup>(32)</sup>.

## 2.2 Problematik Frühgeborener

Aufgrund der Unreife der meisten Organsysteme der Frühgeborenen sowie aufgrund von Infektionen kann es zu einer Reihe von Erkrankungen kommen, die die Hauptursache für die neonatale Mortalität oder erworbene Behinderungen darstellen. Vor allem für Frühgeborene <32. Gestationswoche besteht eine hohe Gefahr der Spätmorbidität besonders im Bereich der Lungen, der Augen und des zentralen Nervensystems <sup>(82)</sup>. Zu den häufigsten Todesursachen zählen das respiratory distress syndrome (RDS), intraventrikuläre Hämorrhagien, kongenitale Anomalien, nekrotisierende Enterocolitis, Infektionen und chronische Lungenerkrankungen <sup>(6)</sup>. Der stärkste Anstieg in Bezug auf Überlebensrate und Langzeitresultat findet sich zwischen der 22. und 25. SSW <sup>(97)</sup>. Nach einer Studie des NICHD Neonatal Research Network <sup>(97)</sup> ist bei einer Geburt in der 22. SSW in 100% der Fälle mit bleibenden Gesundheitsschäden zu rechnen, in der 23. SSW in 92%, in der 28. SSW noch in 43% - wobei der größte Anteil auf Infektionen und bronchopulmonale Dysplasie entfällt.

Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden auf die Bereiche Atem- und Immunsystem sowie Darmtrakt eingegangen.

Surfactant – eine von Pneumozyten Typ II gebildete Emulsion, die die Oberflächenspannung der Alveolen herabsetzt, wird erst ab der 35. Schwangerschaftswoche ausreichend gebildet. Daher leiden bis zu 60% der Frühgeborenen <30. Gestationswoche an einem Atemnotsyndrom bzw. einem respiratory distress syndrome (RDS) <sup>(51)</sup>. Zusätzlich besteht bei sehr kleinen Frühgeborenen ein noch nicht ausreichend entwickeltes

Lungenepithel <sup>(83)</sup>. Die dadurch oft notwendige maschinelle Beatmung kann durch Barotrauma und Sauerstofftoxizität eine Schädigung des Lungenepithels mit daraus resultierender Azidose verursachen und somit zu einem Circulus vitiosus führen <sup>(60)</sup>. Durch eine begleitende Sepsis oder intrauterine Asphyxie wird die Situation deutlich verschlechtert. Zur Verbesserung der Symptomatik trug die industrielle Herstellung von Surfactant bei, ebenso die Lungenreifeinduktion mit Beclomethason vor drohender Frühgeburt, die zwar zwischen der 24. und 28. SSW die Mortalität günstig beeinflusst, aber erst ab der 29. SSW die Häufigkeit und Schwere eines RDS signifikant senkt <sup>(83)</sup>. Vor allem bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g kann aus dem Umstand der Lungenunreife und deren Behandlung eine chronische Lungenerkrankung - eine bronchopulmonale Dysplasie - resultieren <sup>(51)</sup>.

Die Unreife des Darmtraktes des Frühgeborenen bereitet nicht nur Probleme beim Nahrungsaufbau, sondern kann auch zu einer nekrotisierenden Enterocolitis (NEC) führen, einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Entzündung des Dün- und Dickdarmes. Bei einem Geburtsgewicht <1500g liegt die Inzidenz bei 2 bis 9%, mit einer Letalität bis zu 50%. Die nekrotisierende Enterocolitis entsteht durch eine Sauerstoffunterversorgung der Darmwand, z.B. im Rahmen einer perinatalen Asphyxie. Begünstigend kommt eine Schädigung der Darmwand durch hyperosmolare Nahrung und Medikamente hinzu. Hierdurch wird Bakterien der Übertritt aus dem Darmlumen in die Darmwand erleichtert und es kommt zu Lufteinlagerungen mit möglicher Perforation, Gangrän oder Peritonitis <sup>(51)</sup>. De la Cochetière et al. untersuchten Frühgeborene, von denen drei unter einer nekrotisierenden Enterocolitis litten. Durch molekulare Untersuchung von DNA im Stuhl mittels TGGE (Temperaturgradientengelelektrophorese) konnten sie *Clostridium perfringens* nachweisen und vermuteten einen Zusammenhang mit der Erkrankung <sup>(22)</sup>. Wang et al. fanden heraus, dass bei Frühgeborenen mit NEC eine geringere Bakteriendiversität vorliegt – so zeigten diese Kinder in der Darmmikrobiota einen höheren Anteil an *Proteobacteria* (z.B. *Enterobacteriaceae*) und einen geringeren an *Firmicutes*-Bakterien (z.B. Streptokokken, Lactobacillen) <sup>(102)</sup>. Auch Stewart et al. führten die Ursachen für NEC weniger auf einzelne Keime als vielmehr auf eine Verschiebung in der prozentualen Verteilung der einzelnen Bakterien zurück <sup>(93)</sup>. Demgegenüber zeigten Mshvildadze et al., dass bei jedem Frühgeborenen eine

völlig unterschiedliche bakterielle Komposition im Darm besteht und man keinen wesentlichen Unterschied in der Verteilung der Keime bei NEC aufweisen kann <sup>(66)</sup>.

Beachtenswert scheint auch das bei Frühgeborenen oft spätere Absetzen von Mekonium. Bei Kindern mit einem Geburtsgewicht <1000g wird Mekonium durchschnittlich nach 3 Tagen ausgeschieden, 30% setzen Mekonium erst nach bis zu 7 Tagen ab <sup>(60)</sup>. Lembet et al. fanden heraus, dass Mekonium das Bakterienwachstum verstärkt, indem sie Mekonium mit verschiedenen Bakterien beimpften <sup>(53)</sup>.

Aufgrund des unreifen Immunsystems, aber auch aufgrund der Umstände der Frühgeburtlichkeit, treten Infektionen bei Frühgeborenen häufiger auf als bei Termingeborenen <sup>(60)</sup> und können besonders schwere Verläufe nehmen. Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort sind beim Frühgeborenen erheblich eingeschränkt, was die systemische Ausbreitung der Erreger begünstigt <sup>(51)</sup>. Azizia et al. fanden heraus, dass es darüber hinaus bei einer vorgeburtlichen Infektion, z.B. im Rahmen einer Chorioamnionitis, zu einer Immunoparalyse kommt. Dabei spielt insbesondere eine reduzierte Expression von MHC II (major histocompatibility complex) und eine verminderte Ausschüttung des Zytokins TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor) eine Rolle, beides wichtige Bestandteile der Immunantwort <sup>(5)</sup>. Die Unreife und Suppression des Immunsystems erhöhen die Gefahr einer Sepsis, z.B. von einem lokalen Entzündungsprozess ausgehend.

### **2.3 Infektionen als Ursache einer Frühgeburt**

Zu den Hauptursachen für eine Frühgeburt zählen Infektionen <sup>(76, 82)</sup>. In über 30% der Fälle liegt einer Frühgeburtlichkeit ein vorzeitiger Blasensprung, in ca. 20% eine vorzeitige Wehentätigkeit zugrunde <sup>(91)</sup>. Beide werden häufig durch Mehrlingsschwangerschaft oder Infektionen verursacht, wobei die auslösenden Keime nicht immer nachweisbar sind und eine intrauterine Infektion oft subklinisch verläuft. Nur 12,5% der Frauen mit vorzeitiger Wehentätigkeit, intakter Fruchtblase und einem positiven Bakteriennachweis aus Fruchtwasser zeigen klinische Zeichen einer intra-uterinen Infektion <sup>(76)</sup>.

Infektionen von Feten und Neugeborenen können sowohl nach dem Infektionszeitpunkt als auch nach dem Infektionsweg eingeteilt werden. Bezüglich des Zeitpunktes kann eine Infektion während der Schwangerschaft, in den Tagen kurz vor (peripartal), unter (sub partu) oder nach der Geburt (postpartal) erfolgen. Peripartal kann eine Infektion durch eine aufgelockerte Plazentaschranke und fetomaternalen Mikrotransfusionen erfolgen, sub partu eher ascendierend über einen vorzeitigen Blasensprung oder Wehentätigkeit, aber auch bei der Passage der Geburtswege.

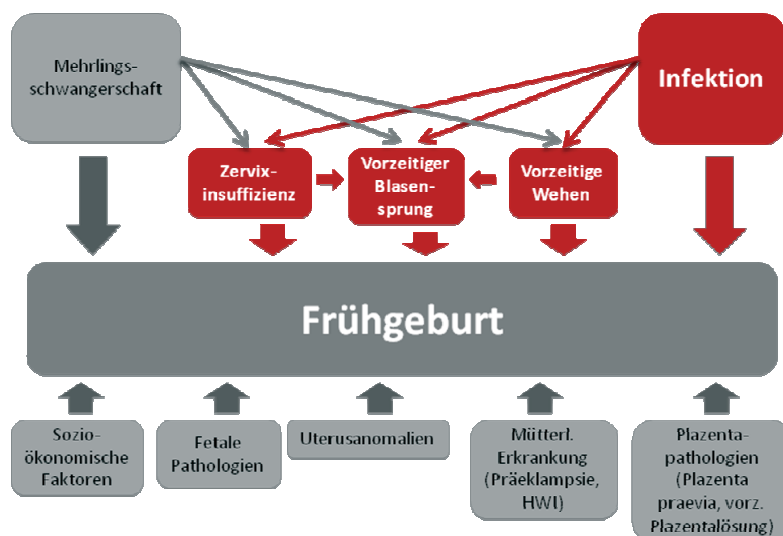


Abb. 2.1: Ursachen der Frühgeburt. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Ursachen von Frühgeburten. Rot hervorgehoben sind die für die vorliegende Arbeit relevanten Ursachen (HWI = Harnwegsinfekt; vorz. = vorzeitig).

Hinsichtlich der Infektionswege unterscheidet man eine ascendierende, d.h. vaginal und/oder über die Eihäute aufsteigende Infektion, von einer transplazentären bei einer systemischen Infektion der Mutter. Darüber hinaus kann eine intrauterine Infektion auch durch entzündliche Prozesse innerhalb der Bauchhöhle retrograd über die Eileiter oder im Rahmen von transabdominalen invasiven Untersuchungen wie Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie erfolgen. Transplazentäre Infektionen entstehen meist bei einer Virämie der Mutter, sie können aber auch durch einige Bakterien wie *Treponema pallidum* oder *Listeria monocytogenes* verursacht werden. Diaplazentar übertragene *Listeria* oder *Toxoplasma gondii* können darüber hinaus über eine Infektion der Plazenta und der Eihäute zu einer Frühgeburtlichkeit führen <sup>(82)</sup>. Am häufigsten sind jedoch ascendierende intrauterine Infektionen, die meist bakteriell bedingt sind <sup>(48, 76)</sup>.



Die Bakterien, die dabei im Fruchtwasser nachgewiesen werden können, finden sich auch in der Vaginalmikrobiota der jeweiligen Mutter <sup>(48)</sup>.

Bei intakter Fruchtblase stellen sowohl der zervikale Schleimpfropf als auch die Eihäute eine natürliche Barriere gegen aufsteigende Keime dar. Aber auch bei nicht eröffneter Fruchtblase und asymptomatischen Schwangeren lassen sich bei ca. 4% Bakterien im Fruchtwasser finden <sup>(88)</sup>. Bei vorzeitiger Wehentätigkeit steigt die Häufigkeit eines Bakteriennachweises im Fruchtwasser bei intakten Membranen auf 12,5% bzw. 15%, bei einer Zervixinsuffizienz auf 50% <sup>(23, 76)</sup>. Ein Keimnachweis im Fruchtwasser bei intakten Eihäuten korreliert mit Chorioamnionitis, konnataler Pneumonie und Frühgeburtlichkeit. Eine bakterielle Ausbreitung über die Dezidua in die fetalen Blutgefäße oder über Chorion und Amnion in das Fruchtwasser mit anschließender Aspiration durch das ungeborene Kind können zu einer Bakteriämie bzw. Sepsis des Kindes führen <sup>(76)</sup>. Die höhere Sepsisrate bei Frühgeborenen könnte damit nicht nur mit der Unreife und Suppression des Immunsystems zusammenhängen, sondern auch mit intrauterinen, die Frühgeburt auslösenden Infektionen <sup>(48, 76)</sup>.

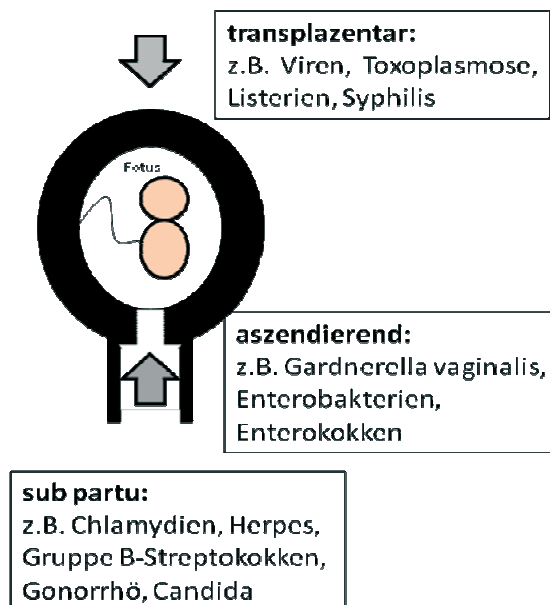


Abb 2.2: Mögliche Infektionswege beim Fötus. Schematisch dargestellt sind der Fötus im Uterus und transplazentare und aufsteigende Infektionswege sowie eine Übertragung sub partu

Zu den Bakterien, die vorwiegend durch eine Aszension innerhalb der weiblichen Genitalorgane oder bei der Passage durch den Geburtskanal während der Geburt zu einer Infektion des Kindes führen können, zählen z.B. *Streptococcus* der Serogruppe B,

*Chlamydia trachomatis*, Anaerobier wie *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* sowie Darmbakterien, *Staphylococcus* und *Enterococcus*. Zu den gravierendsten Infektionen bei Neugeborenen zählen die durch *Streptococcus* der Serogruppe B – sogenannte B-Streptokokken - verursachten. Diese Bakterien kommen bei 5-30% aller Frauen im Genitaltrakt vor <sup>(72)</sup>, eine Übertragung auf das Kind erfolgt meist während der Geburt. Ein Zusammenhang besteht zwischen einer genitalen Besiedelung mit „B-Streptokokken“ und vorzeitigem Blasensprung, Chorioamnionitis und Frühgeburtslichkeit. Beim Neugeborenen können die „B-Streptokokken“ zu einer oft tödlich verlaufenden Sepsis oder Meningitis führen, wobei die Infektion in einen early-onset und einen late-onset type unterteilt werden. Die Frühform geht mit einer Letalität von bis zu 20% einher <sup>(72)</sup>. Besonders Frühgeborene sind von der Frühform betroffen – es ist anzunehmen, dass „B-Streptokokken“ der Mutter durch ein Amnioninfektionssyndrom zur Frühgeburt führen. Je unreifer das Frühgeborene, desto wahrscheinlicher kommt es dabei zu einer Sepsis <sup>(82)</sup>. Auch die durch fakultative Anaerobier wie *Gardnerella vaginalis* verursachte bakterielle Vaginose steht mit einem vorzeitigem Blasensprung sowie Frühgeburtslichkeit in Zusammenhang <sup>(72)</sup>. Darüber hinaus gibt es ebenso Zusammenhänge mit einer Infektion durch den intrazellulären Erreger *Chlamydia trachomatis*, der sich bei bis zu 13% der Schwangeren findet <sup>(91)</sup> und mit *Neisseria gonorrhoeae*, beide durch Sexualkontakte oder Schmierinfektion übertragen.

Neben zahlreichen weiteren Faktoren können ascendierende Infektionen eine vorzeitige Wehentätigkeit auslösen <sup>(60, 82)</sup>, die über eine Verkürzung und Auflockerung der Zervix mit Eröffnung des Muttermundes oder über einen vorzeitigem Blasensprung eine Frühgeburt bedingen kann <sup>(82)</sup>. Darüber hinaus kann durch ascendierende Infektionen eine Zervixinsuffizienz entstehen. Hierunter versteht man eine schmerzfreie Konsistenzänderung und Verkürzung der Zervix mit einer Eröffnung des Muttermundes, die meist ohne von der Schwangeren wahrgenommene Myometriumkontraktionen einhergeht. Durch die Öffnung der Geburtswege besteht ebenfalls die Gefahr einer Frühgeburt <sup>(82)</sup>.

Ebenfalls infektionsbedingt kann es in der Schwangerschaft zu einem vorzeitigem Blasensprung (PROM = premature rupture of membranes) kommen, bei dem es sich um einen Fruchtwasserabgang durch eine Ruptur der Fruchtblase handelt, bevor Eröffnungswehen eingesetzt haben. Bezüglich des Zeitpunkts des Auftretens kann der

PPROM (preterm premature rupture of membranes), der frühe vorzeitige Blasensprung vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche, abgegrenzt werden. Letzterer tritt in etwa 2-5% der Schwangerschaften auf und ist mit einem Drittel aller Frühgeburten eine deren häufigster Ursachen <sup>(82)</sup>. Dabei führen vaginal aufsteigende Bakterien am unteren Eipol zu einer Aktivierung der Arachidonsäurekaskade mit Freisetzung von Prostaglandinen <sup>(72)</sup>. Hierunter kommt es neben einer Aufweichung der Eihäute zu einer vorzeitigen Wehentätigkeit, die über eine Erhöhung des intraamniotischen Drucks oder über Scherkräfte einen Blasensprung auslösen kann. Je früher in der Schwangerschaft ein Blasensprung auftritt, desto häufiger liegt eine Infektion als Ursache vor <sup>(82)</sup>.

Beim vorzeitigen Blasensprung ist die das Kind schützende Barriere nicht mehr gegeben, so dass sich eine bereits bestehende oder neu hinzukommende vaginale Infektion auf das Amnion, das Fruchtwasser und die Plazenta, auf das Kind und die Unterleibsorgane der Mutter bis hin zu einer Sepsis ausbreiten kann (Amnioninfektionssyndrom). Dieser Prozess wird begünstigt durch abgehendes Fruchtwasser, das das saure und damit schützende Scheidenmilieu neutralisiert. Die Erreger gelangen über Mund, Nase, Lunge und Darm oder - bei infizierter Plazenta - über die Nabelschnur in das ungeborene Kind. Beim Vorliegen einer Chorioamnionitis besteht ein Risiko von 10% für ein reifes Kind, eine Sepsis zu entwickeln. Bei Frühgeborenen liegt der Prozentsatz deutlich höher <sup>(82)</sup>. Das Risiko eines Amnioninfektionssyndroms steigt mit zunehmender Liegedauer nach eröffneter Fruchtblase. Auch begleitende Wehentätigkeit spielt eine große Rolle bei der Begünstigung eines Keimübertritts von vaginal auf die Eihäute und das Fruchtwasser. Im Fruchtwasser befinden sich infektionshemmende Stoffe, wie z.B. Lysozym, ein antibakterielles Peptid, Zink und Antikörper – begünstigend für Bakterienwachstum wirkt vor allem Mekonium im Fruchtwasser <sup>(53, 88)</sup>. Durch bakteriologische Untersuchungen von Fruchtwasser konnten vor allem Anaerobier, *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus* nachgewiesen werden, die ein Amnioninfektionssyndrom hervorrufen können. Diese Keime wurden ebenfalls - neben den vorherrschenden Laktobacillen - in der Vaginalmikrobiota von Schwangeren gefunden <sup>(88)</sup>, aber auch *Staphylococcus* und *Enterococcus* wurden beschrieben <sup>(91)</sup>. Reservoir für diese Keime ist meist die Darmmikrobiota der Mutter, aber auch die orale Mikrobiota der Mutter und deren Partner. Bei vorzeitiger Wehentätigkeit und/oder vorzeitigem Blasensprung konnten im Fruchtwasser *Ureaplasma urealyticum*,

*Fusobacterium nucleatum* und *Mycoplasma hominis* nachgewiesen werden <sup>(31, 76)</sup>. Han et al. fanden im Fruchtwasser von Frauen mit drohender Frühgeburt eher niedrig virulente Keime – in der Gebärmutter wird durch diese jedoch eine Entzündungskaskade aktiviert, die über die Ausschüttung von Zytokinen, Prostaglandinen etc. zur Zervixreifung, vorzeitigem Blasensprung und Myometriumkontraktionen führt <sup>(38)</sup>. Sogar bei asymptomatischen Frauen im mittleren Trimenon konnten Bakterien wie z.B. *Chlamydia trachomatis*, Corynebakterien und *Propionibacterium sp.* gefunden werden <sup>(58)</sup>.

## **2.4 Bakterielle Besiedelung von Darmtrakt und unteren Atemwegen bei Frühgeborenen**

Der Mutterleib als den Fötus schützende Umgebung galt lange als in der Regel keimfrei. Verschiedene Studien haben mittlerweile nachgewiesen, dass sich sowohl bei asymptomatischen Schwangeren, insbesondere aber bei Müttern mit drohender Frühgeburt Bakterien im Fruchtwasser nachweisen lassen. Spätestens jedoch während der Geburt nach der Ruptur der Fruchtblase kommt das Kind mit Bakterien in Kontakt, z.B. mit der Vaginal- und Darm- sowie Hautmikrobiota der Mutter. Eine bakterielle Besiedelung der Haut und Schleimhaut des Kindes läßt sich bereits am ersten Lebenstag nachweisen <sup>(77)</sup>.

Die bakterielle Besiedelung des Darmtraktes von Neugeborenen wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst, z.B. von der Nahrung, die dem Säugling zugeführt wird, vom Geburtsmodus und der Umgebung <sup>(9, 27)</sup>. So siedeln sich bei gesunden Neugeborenen zunächst fakultativ anaerobe Bakterien wie *Enterobacter*, *Enterococcus* und *Staphylococcus* an. Innerhalb der ersten Lebensstage kommen bei gestillten Kindern Bifidobakterien hinzu und sind ab dem Ende der ersten Lebenswoche dominanter Bestandteil der Darmmikrobiota. Bei Kindern, die mit Ersatzmilch gefüttert wurden, finden sich mehr Anaerobier wie *Clostridium* und *Bacteroides*, und die Besiedelung mit *Bifidobacterium* als dominantem Keim ist verzögert <sup>(27, 56, 90)</sup>. So wiesen bei Sakata et al. mit Muttermilch ernährte Kinder am 7. Lebenstag ein Verhältnis von *Enterobacteriaceae* zu *Bifidobacterium* von 1:1000 auf, bei mit Ersatzmilch ernährten Kindern

betrug dieses Verhältnis 1:10 nach 7 Lebenswochen <sup>(80)</sup>. El-Mohandes et al. fanden bei Kindern, die mit Ersatzmilch gefüttert wurden, häufiger *Klebsiella* <sup>(26)</sup>. Nach Entbindung durch Sectio caesarea zeigt sich die Besiedelung des Darmtraktes insgesamt verzögert, und man findet häufiger *Clostridium* als nach vaginaler Entbindung <sup>(9, 27)</sup>. Ein Krankenhausaufenthalt nach Geburt scheint zu vermehrter Besiedelung mit *Klebsiella* und *Proteus* zu führen <sup>(9, 35)</sup>.

Da bei Frühgeborenen fast alle oben genannten die Darmmikrobiota beeinflussenden Faktoren zusammenkommen, zeigen sich bei ihnen einige Besonderheiten im Vergleich zu reifen Neugeborenen. Initial finden sich vor allem *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus*, sowie weniger koliforme Keime und *Lactobacillus* als bei reifen Neugeborenen. Bei den *Enterobacteriaceae* überwiegen *Klebsiella* und *Enterobacter* gegenüber *E.coli*. Auch die Besiedelung mit *Bifidobacterium* ist deutlich verzögert und tritt meist erstmals am Ende der zweiten Lebenswoche auf <sup>(27)</sup>. Stevenson et al. fanden bei hospitalisierten Frühgeborenen in der zweiten Lebenswoche ähnliche Ergebnisse: Im Gegensatz zu Termingeborenen zeigten sie eine Dominanz von *Enterobacteriaceae* und einen Mangel an obligaten Anaerobiern, zu denen auch *Bifidobacterium* gehört <sup>(92)</sup>. Stark und Lee fanden heraus, dass bei Frühgeborenen die Besiedelung mit fakultativen Anaerobiern, z.B. *Enterobacteriaceae*, beginnt und sich auf hohem Niveau hält. Am Ende der ersten Lebenswoche zeigte sich erst bei 50% der Kinder *Bifidobacterium*, insgesamt erschien *Bifidobacterium* noch später als bei den Termingeborenen, die mit Ersatzmilch gefüttert wurden. Auch zeigten die Frühgeborenen mehr *Bacteroides* <sup>(90)</sup>. Bei einer Untersuchung des Stuhls von sehr kleinen Frühgeborenen fanden Sakata et al. heraus, dass bei den Frühgeborenen erst nach durchschnittlich rund 20 Tagen *Bifidobacterium* in der Stuhlmikrobiota dominiert, wahrscheinlich aufgrund der geringen Milchzufuhr <sup>(80)</sup>. Eine molekulare Untersuchung des Stuhls von Frühgeborenen mittels DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese) durch Millar et. al zeigte mehrere bisher schwer kultivierbare Keime, wie z.B. *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ewingella americana*, *Actinomycetes* etc <sup>(61)</sup>. Schwiertz et al. fanden heraus, dass bei Frühgeborenen zunächst wenig Diversität innerhalb der Stuhlmikrobiota vorhanden ist und im Laufe der Zeit die Darmmikrobiota der Säuglinge sowohl intra- als auch inter-individuell eine hohe Ähnlichkeit aufweist <sup>(85)</sup>. Die geringere Diversität im Vergleich zu Termingeborenen und der höhere Anteil an Proteobakterien wie z.B. *Entero-*

*bacteriaceae* ließ sich auch mit neueren molekularbiologischen Untersuchungen bestätigen <sup>(66, 102)</sup>.

Bei Mekonium, dem ersten von Neugeborenen abgesetzten Stuhl, handelt es sich um ein dunkelgrünes zähes Gemisch aus Gallensekreten, Fruchtwasserbestandteilen, Lanugo-haaren und kindlichen Hautschuppen, die durch Schluckbewegungen des Kindes im Mutterleib in den kindlichen Darmtrakt gelangen. Mekonium galt lange Zeit unter der Annahme, dass Fruchtwasser vor der Ruptur der Fruchtblase keimfrei sei, als steril. Rotimi et al. konnten jedoch bereits 1981 im Mekonium von 23 gestillten reifen Neugeborenen *Staphylococcus albus*, *Streptococcus* und *Enterococcus* kulturell nachweisen <sup>(77)</sup>. Hufnagel et al. zeigten, dass besonders Frühgeborene mit einem Gestationsalter <32 Wochen in 33% der Fälle im Mekonium und in Körperabstrichen eine Besiedelung mit *Enterococcus* aufweisen. Besonders häufig fanden sie *Enterococcus faecium* <sup>(44)</sup>. In neueren molekularbiologischen Untersuchungen ließ sich sogar in allen <sup>(93)</sup> bzw. in 91% <sup>(66)</sup> der Mekoniumproben bakterielle DNA nachweisen. Auch Madan et al. fanden mit kulturunabhängigen Methoden im Mekonium von Frühgeborenen unter anderem *Lactobacillus*, *Staphylococcus* und *Enterobacteriaceae* <sup>(57)</sup>. Lembet et al. fanden heraus, dass Mekonium Bakterienwachstum sogar begünstigt: Nach Beimpfung von Mekonium mit verschiedenen Keimen in einer Konzentration von  $10^6$  CFU kam es nach 24 Stunden Bebrütung zu einer Vermehrung der Bakterien um den Faktor  $10^3$  <sup>(53)</sup>.

Da viele - besonders sehr kleine Frühgeborene - beatmet werden müssen, liegen einige Studien zur bakteriellen Besiedelung von Trachealsekret vor, vor allem zu Bakterien wie *Ureaplasma sp.*, die mit der Genese der bronchopulmonalen Dysplasie in Verbindung gebracht werden <sup>(10,19, 20)</sup>. Mourani et al. fanden heraus, dass die Atemwege bei intubierten Frühgeborenen bereits früh bakteriell besiedelt sind. So fanden sie mit molekulardiagnostischen Methoden nach 72h Beatmungsdauer bereits vereinzelt *Ureaplasma parvum* und *Enterococcus faecalis*. In den ersten 21 Tagen Beatmung fanden sich vor allem *Ureaplasma sp.*, koagulasenegative *Staphylococci*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* und *E. coli*. Dabei konnten verschiedene Keime nicht angezüchtet werden und nur über molekulardiagnostische Verfahren nachgewiesen werden <sup>(65)</sup>. In einer Studie von Booth et al. zeigten sich 6,5% der untersuchten Trachealsekrete nach einer Beatmungsdauer von

≤12 Stunden kulturpositiv mit Bakterien wie *E. coli*, *Streptococcus* der Serogruppe B und *Haemophilus influenzae*<sup>(13)</sup>.

## 2.5 Sepsis des Frühgeborenen

Bei einer Sepsis handelt es sich um eine lebensbedrohliche Erkrankung, bei der Bakterien oder deren Toxine von einem lokalen Entzündungsherd in die Blutbahn gelangen. Es kommt dabei zu schweren Allgemeinsymptomen wie Fieber oder Hypothermie, Tachykardie und Tachypnoe. Im Rahmen der hämatogenen Streuung können andere Organe betroffen sein, was zur Organdysfunktion führen kann. Im schlimmsten Fall kommt es zum septischen Schock mit Kreislaufversagen. Laborchemisch finden sich Zeichen einer Entzündung wie Leukozytose oder Leukopenie sowie ein Anstieg des C-reaktiven Proteins<sup>(36)</sup>. Die Sepsis des Frühgeborenen ist neben der Unreife eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität<sup>(7)</sup>, Frühgeborene mit einer Sepsis entwickeln häufiger neurologische Folgeerkrankungen<sup>(25)</sup>.

In den westlichen Industrieländern erkranken 0,1-0,4% aller Lebendgeborenen an einer Sepsis, auf neonatologischen Intensivstationen liegt die Inzidenz mit etwa 25% deutlich höher mit steigender Tendenz in den letzten 20 Jahren<sup>(51)</sup>. Beim Vorliegen einer Chorioamnionitis besteht ein Risiko von 10% für ein reifes Kind, eine Sepsis zu entwickeln. Bei Frühgeborenen liegt der Prozentsatz deutlich höher<sup>(82)</sup>. Unterteilt wird die Sepsis in eine Frühform mit Beginn in den ersten drei Tagen nach Geburt und einer Spätform nach mehr als drei Lebenstagen<sup>(25, 103)</sup>.

Bei der Frühform werden die verursachenden Bakterien bereits im Mutterleib oder bei der Passage des Geburtskanals erworben, oft im Zusammenhang mit einem vorzeitigen Blasensprung, einem Amnioninfektionssyndrom oder einer Bakteriämie der Mutter. Gemäß der Pathogenese finden sich ursächlich meist Keime aus dem Genital- oder Darmtrakt der Mutter, wie z.B. *E.coli*, *Listeria*, *Streptococcus* der Serogruppe B, *Enterococcus* und *Staphylococcus aureus*, der Verlauf ist meist fulminant<sup>(51)</sup>. Die Inzidenz der Frühform ist in den letzten Jahren stabil und liegt bei etwa 0,1% aller

Geburten, ist jedoch mit etwa 1,5% bei den Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <32 Wochen deutlich höher<sup>(94, 96, 103)</sup>. Dabei ist festzustellen, dass umso häufiger eine Sepsis auftritt, je niedriger das Gestationsalter des Frühgeborenen ist<sup>(86)</sup>. Der Anteil an Streptokokken der Gruppe B innerhalb des Erregerspektrums ist in den letzten 15 Jahren durch entsprechende Prophylaxe rückläufig. Während bei reifen Neugeborenen die Frühform der Sepsis hauptsächlich durch B-Streptokokken und koagulasenegative Staphylokokken verursacht wird<sup>(86)</sup>, besteht das Erregerspektrum bei Frühgeborenen zu 52,9% aus gramnegativen Bakterien, wovon *E.coli* den größten Teil einnimmt. Etwa 45% entfallen auf grampositive Bakterien, wobei koagulasenegative Staphylokokken hierbei den größten Anteil tragen<sup>(86, 96)</sup>. Mit kulturunabhängigen Methoden konnten Wang et al. bislang unbekannte Verursacher einer früheinsetzenden Sepsis nachweisen, wie z.B. *Bergeyella*, *Fusobacterium nucleatum* und *Sneathia sanguinegens*. Sie untersuchten Fruchtwasser, Nabelschnurblut und Blut der Frühgeborenen und fanden als häufigste sepsisverursachende Bakterien *E.coli* und *Fusobacterium nucleatum*<sup>(101)</sup>.

Die Mortalität bei einer früheinsetzenden Sepsis liegt insgesamt bei 10,9%, bei Frühgeborenen bei etwa 37%. Den größten Anteil an einem tödlichen Ausgang trägt dabei eine Sepsis durch *E.coli*<sup>(94, 103)</sup>. Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer früheinsetzenden Sepsis gelten (prolongierter) vorzeitiger Blasensprung, extreme Unreife des Frühgeborenen, Chorioamnionitis, mütterliches Fieber sub partu sowie Funisitis, eine Entzündung der Nabelschnur<sup>(52, 59, 94)</sup>.

Die Spätform der Sepsis ist meist nosokomial bedingt<sup>(51)</sup>, die Inzidenz bei Frühgeborenen beträgt etwa 21% und steigt, je niedriger das Gestationsalter und Geburtsgewicht sind. So tritt bei Kindern mit einem Gestationsalter <25 Wochen in 46% eine Sepsis auf, bei 25. bis 28. Woche bei 29%. Verursacht wird die Spätform der Sepsis beim Frühgeborenen hauptsächlich durch grampositive Bakterien, insbesondere koagulasenegative Staphylokokken, darüber hinaus *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.* und Streptokokken der Gruppe B. Der Anteil an gramnegativen Bakterien im Erregerspektrum beträgt etwa 18%, allen voran *E.coli*, aber auch *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* und *Serratia sp.*<sup>(95)</sup>. Die Mortalität beträgt etwa 18%, dabei tragen die gramnegativen Bakterien deutlich häufiger zu einem tödlichen Verlauf bei – bei einer Sepsis mit *Pseudomonas* liegt die Mortalität bei bis zu 74%<sup>(25)</sup>. Die antibiotische Prophylaxe, die Frühgeborenen oft nach der Geburt verabreicht wird,



erschwert die Erregerdiagnostik einer Sepsis durch Blutkulturen, trotz klinischer Zeichen ist diese meist negativ <sup>(59, 60)</sup>. Als Risikofaktoren gelten neben geringem Geburtsgewicht und niedrigem Gestationsalter vorangegangene Antibiose, lange Beatmungsdauer, zentralvenöse Zugänge, unzureichende Händehygiene des Klinikpersonals, parenterale Ernährung und nekrotisierende Enterokolitis <sup>(25, 95)</sup>. Es gibt mehrere Hinweise auf den Darm als mögliches Erregerreservoir <sup>(4, 8, 87, 89)</sup>. Eine bakterielle Translokation vom Darmlumen in das Darmgewebe und die Blutbahn scheint durch mehrere Mechanismen denkbar. Zum einen zerstören Bakterientoxine und andere Bakterienprodukte die interzellulären Verbindungen - tight junctions – des Darmepithels, so dass die Darmbarriere durchlässig und eine parazelluläre Translokation von Bakterien möglich wird. Eine transzelluläre Translokation von Bakterien wird über Rezeptoren oder M-Zellen des Darms ermöglicht, so dass die Bakterien die Darmbarriere überwinden und z.B. über unreife Makrophagen innerhalb des Gewebes und des Blutes disseminieren können. Neben den tight junctions wird die Darmbarriere durch Schleim mit antimikrobiellen Substanzen aus den Paneth-Zellen sowie durch probiotische Bakterien aufrechterhalten. Bei Frühgeborenen ist jedoch die Anzahl an Paneth-Zellen deutlich vermindert. Darüber hinaus ist die Entwicklung einer probiotischen Darmmikrobiota bei Frühgeborenen deutlich verzögert <sup>(87)</sup>. Madan et al. fanden im Mekonium von Frühgeborenen mit kulturunabhängigen Methoden verschiedene Bakterien, allen voran Laktobacillen, Staphylokokken und Enterobakterien und beobachteten gleichzeitig, dass die Diversität der Mikrobiota im Mekonium bei Frühgeborenen mit später auftretender Sepsis reduziert war <sup>(57)</sup>.

## **2.6 16S-rDNA Approach zur Diagnostik der konnatalen Sepsis, kulturnegativer Proben und polymikrobieller Gemeinschaften**

Wie weiter oben beschrieben, haben Frühgeborene aufgrund der Unreife des Immunsystems und der Umstände der Frühgeburtlichkeit ein höheres Risiko für eine konnatale Sepsis. Zur Prophylaxe erhalten vor allem sehr kleine Frühgeborene kurz nach der Geburt Breitbandantibiotika. Goldstandard in der Diagnostik der Sepsis ist die Blutkultur – diese zeigt jedoch nur in 25% der Fälle einen positiven Befund und hat eine niedrige Sensitivität. Dazu kommt, dass der kulturelle Erregernachweis zum einen

durch die Verabreichung von Antibiotika, zum anderen durch das geringe Blutvolumen der Frühgeborenen erschwert wird, da aus diesem Grund häufig nicht die für eine Blutkultur erforderliche Menge an Blut entnommen werden kann. Zudem ist die Inkubationszeit einer Blutkultur bezogen auf die Schwere der Erkrankung und den daher notwendigen raschen Handlungsbedarf verhältnismäßig lang <sup>(75)</sup>. Daher wurde verschiedentlich bereits versucht, die Sepsis-Diagnostik durch kulturunabhängige Methoden zu ergänzen <sup>(69, 75)</sup>. Hierbei erreichten Reier-Nilsen et al. bei der PCR von Blutproben verglichen mit der Blutkultur eine Sensitivität von 66,7% und eine Spezifität von 87,5%. Mit beiden Methoden gemeinsam konnten sie bei 35,5% der untersuchten Kinder eine bakterielle Sepsis nachweisen. Ohlin et al. konnten mit einer höheren Patientenzahl bei der PCR von Blutproben verglichen mit Blutkulturen eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 90% beim Nachweis einer Sepsis bei Frühgeborenen erreichen. Sie vermuteten dabei jedoch ein hohes Maß an Kontamination <sup>(69, 75)</sup>. Beide verwendeten für ihre PCR die bakterielle 16S-rDNA, die für die kleine Untereinheit des Bakterienribosoms kodiert und immer öfter zur molekulargenetischen Identifikation von Bakterien genutzt wird <sup>(104)</sup>. Sie besitzt eine Länge von ca. 1542 Basenpaaren und unterteilt sich in für alle Bakterien gleiche, hochkonservierte, sowie in dazwischenliegende, variable Bereiche <sup>(50)</sup>. Dabei werden die variablen Bereiche zur Unterscheidung der Bakterien herangezogen, die hochkonservierten Bereiche als Matrize für Primer <sup>(18)</sup>.

Mithilfe der 16S-rDNA ist es nicht nur möglich, bakterielle DNA aus kulturnegativen Proben oder nach Beginn einer antibiotischen Therapie nachzuweisen, sondern man kann auch polymikrobielle Bakteriengemeinschaften identifizieren, wie sie sich z.B. im Darmtrakt oder bei Mischinfektionen finden <sup>(24)</sup>. Die Analyse von polymikrobiellen Gemeinschaften oder Mischinfektionen bereitet sowohl in kultureller als auch in molekularer Hinsicht Schwierigkeiten. Bei der Anzucht auf Nährböden können Keime mit anspruchsvolleren Lebensbedingungen von anderen Keimen überwuchert werden und so gar nicht erst in Erscheinung treten. Aus molekularer Hinsicht bedarf es zum Nachweis einer solchen Mischinfektion einer Modifikation der herkömmlichen PCR. Bei letzterer haben alle amplifizierten DNA-Fragmente dieselbe Länge, aber unterschiedliche Sequenzen (s. Abb. 2.3).

Da eine Gelelektrophorese DNA nach der Länge auftrennt, muß man bei Mischinfektionen versuchen, sie nach der Sequenz aufzutrennen, um die einzelnen Bakterien identifizieren zu können. Dazu können Verfahren wie die PCR-DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese) oder die TGGE (Temperaturgradientengelelektrophorese) verwendet werden – beide Methoden weisen jedoch sowohl einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand, als auch eine bisher unbefriedigende Reproduzierbarkeit und Spezifität auf<sup>(24)</sup>.

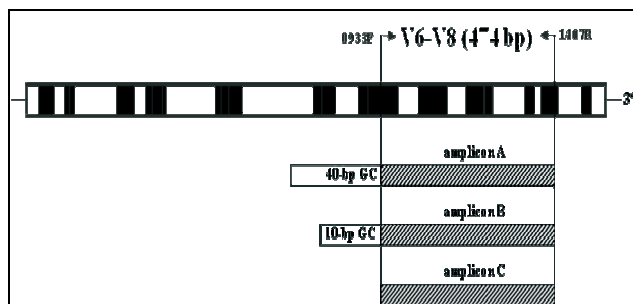


Abb. 2.3: 16S-rDNA aus Mischinfektionen. Die Grafik zeigt die 16S-rDNA, an der die Primer 933F und 1407R binden, wodurch während der PCR Amplicons mit 474 Basenpaaren entstehen. Bei einer Mischinfektion haben diese durch die unterschiedlichen variablen (weißen) Bereich eine unterschiedliche Sequenz, sind aber gleich lang (modifiziert nach Domann et al., 2003).

Domann et al. ist es in Zusammenarbeit mit Transgenomic Inc., USA, gelungen, ein neues molekulares, kulturunabhängiges Verfahren zu entwickeln, dass vollautomatisch und damit schneller und reproduzierbarer als die bisherigen Methoden arbeitet. Hierfür wird die automatisierte und softwaregesteuerte PCR/DHPLC (WAVE<sup>®</sup>-Technologie) von Transgenomic herangezogen, die bisher zur Mutationsanalyse eingesetzt wurde. Das Prinzip beruht auf einer „denaturing high-performance liquid chromatography“ (DHPLC) von Amplifikaten aus der V6-V8 Region der 16S rDNA, die mittels hoher Temperaturen denaturiert und an eine Säule gebunden werden. Über einen speziellen Puffer werden sie sequenzabhängig eluiert. Mit dieser Methode wurde z.B. Urin von Patienten nach Nierentransplantation untersucht, wobei sowohl Mischinfektionen als auch nicht oder nur schwer anzüchtbare Keime nachgewiesen wurden. Mit der PCR/DHPLC kann bakterielle DNA aus bis zu fünf verschiedenen Bakterienspezies aufgetrennt werden<sup>(24, 45)</sup>. Dabei zeigen die Bakterien spezifische Retentionszeiten bei der Eluierung, anhand derer auch eine Identifikation möglich ist<sup>(24)</sup>.

## 2.7 Zielsetzung

Eine Geburt vor der 32. Schwangerschaftswoche geht mit erheblichen gesundheitlichen Problemen und Gefährdungen für das Kind einher. Zu einem großen Teil wird durch eine Infektion eine Kaskade in Gang gesetzt, an deren Ende eine Frühgeburtlichkeit steht. Nicht immer kann dabei der auslösende Erreger nachgewiesen werden. Auch bei einer konnatalen Sepsis, für die vor allem Frühgeborene eine hohe Gefährdung zeigen, ist der Erregernachweis durch Blutkultur aufgrund deren niedriger Sensitivität, des geringen Blutvolumens und der oft schon begonnenen antibiotischen Behandlung schwierig. Zudem ist die Erregerdiagnostik gemessen an dem raschen Krankheitsverlauf einer Sepsis verzögert. Vor diesem Hintergrund scheint es wichtig, sensitivere, reproduzierbare Diagnostikmethoden mit schneller verfügbaren Ergebnissen zu finden.

Darüber hinaus bereitet die Unreife des Darms bei der Behandlung Frühgeborener Probleme. Dazu gehört besonders das erhöhte Risiko für eine nekrotisierende Enterokolitis, für deren Pathogenese eine veränderte Bakterienzusammensetzung vermutet wird und deren Vorliegen wiederum das Auftreten einer Sepsis begünstigt. Auch in anderen Zusammenhängen kommt bei Frühgeborenen der Darm als Erregerreservoir einer späteinsetzenden Sepsis in Betracht. Daher kommt Untersuchungen der Entwicklung der Stuhlmikrobiota bei Frühgeborenen, die bisher kulturell und mittels DGGE sowie TGGE bereits analysiert wurde, eine große Bedeutung zu.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mit konventionellen und kulturunabhängigen Methoden, genauer der PCR/DHPLC, Trachealsekret, Mekonium und Stuhl mit folgender Fragestellung zu untersuchen:

1. Eine Problematik bei der Durchführung von Blutkulturen bei Frühgeborenen ist deren geringes Blutvolumen. Vor diesem Hintergrund wurde zur Sepsisdiagnostik auf leicht zugängliche und nichtinvasiv gewonnene Probenmaterialien in Form von Mekonium und Trachealsekret von beatmeten Kindern zurückgegriffen. Ziel war es, mithilfe dieses Untersuchungsmaterials mögliche Erreger einer konnatalen oder früheinsetzenden Sepsis nachzuweisen.

2. Da Mekonium unter anderem aus in utero geschluckten Fruchtwasserbestandteilen besteht und Bakterienwachstum fördert, sollte mit einer Kombination aus kulturellen und kulturunabhängigen Methoden untersucht werden, ob sich Bakterien als Auslöser der Frühgeburtlichkeit nachweisen lassen. Darüber hinaus sollte diesbezüglich die Studienlage im Hinblick auf nicht oder nur schwer anzüchtbare Keime ergänzt werden.
3. Da die Lunge eines Fetus in utero mit Fruchtwasser gefüllt ist und dieses nach der Geburt resorbiert wird, sollte Trachealsekret der beatmeten Kinder untersucht werden mit der Fragestellung, ob sich auch in diesem Material Bakterien nachweisen lassen, die die Frühgeburtlichkeit ausgelöst haben könnten.
4. Die Entwicklung der Stuhlmikrobiota sollte auf die Darstellbarkeit mittels PCR/DHPLC überprüft sowie die vorhandenen Studien ergänzt werden, vor allem im Hinblick auf nicht oder nur schwer anzüchtbare Keime. Darüber hinaus sollte überprüft werden, inwiefern sich die PCR/DHPLC für die Untersuchung des aus mikrobiologischer Sicht komplexen Materials Stuhl eignet.
5. Darüber hinaus sollte der Stuhl der Frühgeborenen auf mögliche Zusammenhänge mit dem Auftreten einer späteinsetzenden Sepsis untersucht werden.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungen am Menschen**

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde Probenmaterial verwendet, das im Rahmen der medizinischen, mikrobiologischen Routineversorgung zu diagnostischen Zwecken gewonnen wurde (Trachealsekret, Stuhl, Mekonium). Nach der durch die behandelnden Ärztinnen/Ärzte angeforderten mikrobiologischen Routinediagnostik („Standard“) mit zeitnaher Übermittlung der Ergebnisse wurden die projektbezogenen Untersuchungen („Erweiterung des Standards zur verbesserten Diagnostik“) durchgeführt, wobei nur die nach der Routinediagnostik übrig gebliebenen Restmengen („Restmaterial“) verwendet wurden. Eine zusätzliche Belastung für die Patienten entstand dadurch nicht. Bei keinem der Patienten wurden Proben für eine projektbezogene Untersuchung entnommen. Alle Proben wurden nach Abschluss der Untersuchungen sachgemäß vernichtet (autoklaviert) und entsorgt. Bei den Untersuchungen handelte es sich um Maßnahmen zur qualitativen Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik bei Sepsis, hier insbesondere der konnatalen und Neugeborenensepsis, die im Rahmen des Humangenomprojektes NGFN/GRID durchgeführt wurden. Die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin hat den Untersuchungen zugestimmt (Az. 79/01)

#### **3.2 Beschreibung des Patientenkollektivs**

Untersucht wurden Trachealsekret-, Stuhl- und Mekoniumproben von insgesamt 25 Frühgeborenen mit ausgewogenem Geschlechterverhältnis, die vor der vollendeten 32. Schwangerschaftswoche geboren wurden, im Zeitraum von April bis September 2004. Alle Kinder wurden an der Universitätsfrauenklinik Gießen per Sectio caesarea entbunden und anschließend auf der Kinderintensivstation aufgenommen. Im Verlauf wurden alle Kinder auf die neonatologische Station „Moro“ verlegt. Die Gründe für die Frühgeburt waren vielseitig (s.u.). Das jüngste Kind wurde in mit einem Gestationsalter von 24+4 Wochen geboren, das älteste mit 31+3 Wochen, das mittlere Gestationsalter

lag bei 28+3 Tagen ( $\pm$  2 Wochen +0,5 Tage). Das mittlere Geburtsgewicht lag bei 1187g ( $\pm$  372,4g). Unter den 25 Kindern befanden sich 5 Zwillingspaare (Kinder Nr. 3, 4+5, 9+10, 21+22 und 24+25), wobei 1 Zwilling (von Kind 3) nicht in der Kinderklinik aufgenommen wurde. Darüber hinaus gab es ein Drillingstrio (Kinder Nr. 11+12+13). Die mittlere Aufenthaltsdauer der Kinder lag bei 78,3 Tagen ( $\pm$  39,9 Tage), keines der Kinder verstarb während des Aufenthaltes.

Bei allen Kindern waren die Neugeborenen-Abstriche von Achsel, Ohr und Leiste steril, alle erhielten zur Sepsisprophylaxe Antibiotika ab dem Tag der Geburt, in den meisten Fällen Ampicillin und Gentamycin. Die Nahrung der Kinder bestand aus Alfaré® in den ersten Lebenstagen und wurde anschließend durch Prematil® ersetzt. Die Muttermilch wurde bakteriologisch untersucht und bei nachgewiesener Keimfreiheit an die Kinder weitergegeben. Dabei erhielt jedes Kind nur die Milch der eigenen Mutter. In der Zeit zwischen der Abnahme und der Verabreichung wurde die Milch bei -20°C gelagert.

Folgende klinische Daten wurden retrospektiv neben den oben genannten durch Recherche der archivierten Patientenakten erfasst:

- Aussehen des Fruchtwassers
- Vorliegen einer konnatalen Sepsis
- Neugeborenen- und sonstige Abstriche sowie Blutkultur-Ergebnisse
- verabreichte Antibiotika
- Beatmungsdauer
- Begleiterkrankungen und Verlaufsdiagnosen (insbesondere Infektionen und späteinsetzende Sepsis)
- verabreichte Nahrung
- Antibiose und Cervikalabstriche der Mutter
- Schwangerschaftskomplikationen und Ursache der Frühgeburt

Alle Kinder wurden anonymisiert und anschließend durchnummeriert. Die Stuhl- und Trachealsekretproben jedes Kindes wurden jeweils chronologisch nummeriert.

Tabelle 3.1: Übersicht klinische und allgemeine Daten der 25 untersuchten Kinder. Angegeben sind Geschlecht, Gestationsalter, Geburtsgewicht und Ursache der Frühgeburt. Abkürzungen: GG = Geburtsgewicht; path. = pathologisch; CTG = Cardiotokogramm; vorz. = vorzeitig; WT = Wehentätigkeit; AIS = Amnioninfektionssyndrom; MM = Muttermund; steig. = steigende, V.a. = Verdacht auf

Kind Nr.	Geschl.	Gestationsalter	GG	Ursache d. Frühgeburt
1	M	24+4	550g	path. CTG
2	M	28+0	980g	path. Doppler u. CTG
3	M	29+0	1400g	vorz. WT, V.a. AIS
4	F	25+4	850g	MM-Eröffnung, steigende Infektparameter, V.a. AIS
5	F	25+4	880g	MM-Eröffnung, steigende Infektparameter
6	M	28+4	1490g	vorz. WT, Blasensprung, V.a. AIS
7	F	29+3	1100g	path. CTG, fetal distress, Placenta praevia m. Blutung
8	M	26+1	900g	path. CTG, vorz. WT
9	M	30+2	1730g	vorz. WT, Blasensprung
10	M	30+2	1400g	vorz. WT, Blasensprung
11	F	31+1	1630g	vorz. WT, V.a. AIS
12	M	31+1	1280g	vorz. WT
13	M	31+1	1490g	vorz. WT
14	F	28+5	1100g	vorz. WT, Blasensprung, V.a. AIS
15	F	29+0	1320g	path. CTG, vorz. WT, V.a. AIS
16	F	30+5	1760g	path. CTG bei Gestationsdiabetes
17	F	28+3	1180g	path. CTG, vorz. WT, Fruchtblasenprolaps
18	M	28+2	1320g	vorz. WT, Zervixinsuffizienz, V.a. AIS
19	F	24+5	750g	vorz. WT, ansteigende Infektparameter, V.a. AIS
20	F	31+3	1780g	silentes CTG
21	F	26+6	490g	path. CTG bei HELLP-Syndrom
22	M	26+6	700g	path. CTG bei HELLP-Syndrom
23	F	29+2	1530g	mütterliches Karzinom, path. CTG
24	M	27+3	1070g	vorz. MM-Eröffnung, steig. Infektparameter, V.a. AIS
25	F	27+3	990g	vorz. MM-Eröffnung, steig. Infektparameter, V.a. AIS



### 3.3 Materialien und Geräte

#### 3.3.1 Kulturmedien

**Hammelblutagar 5%:** Optimalnährboden zur Anzucht eines breiten Spektrums von Keimen und zur Beurteilung des Hämolyseverhaltens. 30g Columbia-Agar, 750 ml E-Wasser, 37,5ml defibriniertes Hammelblut.

**Kochblutagar 8%:** Wie Blutagar, zusätzlich wächst *Hämophilus*. 40g Tryptic Soy Agar, 1000ml E-Wasser, 80ml defibriniertes Hammelblut, im Wasserbad bei 85°C unter Schütteln bis zur Braunfärbung erhitzen.

**MacConkey-Agar:** Selektivagar zum Nachweis von *Enterobacteriaceae*. 17g/l Pepton aus Casein, 3g/l Pepton aus Fleisch, 5g/l NaCl, 10g/l Lactose, 1,5g/l Gallesalzmischung, 0,03g/l Neutralrot, 0,001g/l Kristallviolett, 13,5g/l Agar-Agar.

**Schaedler-Agar:** Optimalnährboden zur Anzucht von Anaerobiern unter anaeroben Bedingungen. 8,2g/l Casein, 2,5g/l peptisch abgebautes Tiergewebe, 1g/l Sojamehl, 5,8g/l Glucose, 5g/l Hefeextrakt, 1,7g/l NaCl, 0,8g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 0,4g/l L-Cystin, 0,01g/l Hämin, 3g/l Trishydroxyaminomethan, 13,5g/l Agar.

**Lysogeny-broth-Agar/LB-Agar:** Komplexer Nährboden zur Anzucht von Bakterien. 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Trypton, 0,5-10g/l NaCl, 15g/l Agar -> pH-Einstellung 7.

**Müller-Hinton-Agar:** Optimalnährboden zur Antibiotikaresistenzbestimmung mit diversen Antibiotikaplättchen. 2g/l Rindfleisch aus getrockneter Infusion, 17,5g/l Caseinhydrolysat, 1,5g/l Stärke, 17g/l Agar.

**SOB-Medium:** komplexes Nährmedium, das unter anderem für die Transformation von kompetenten Bakterien, z.B. im Rahmen einer Klonierung eingesetzt wird. 5g/l Hefeextrakt, 20g/l Trypton, 10mM Natriumchlorid, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>.

**SOC-Medium:** besteht aus SOB-Medium, das mit 20mM Glucose versetzt wird.

### 3.3.2 Biochemische Identifikation

Die biochemische Identifikation der Bakterien erfolgte mit folgenden Verfahren:

- **Identifikation mit der „Kurzen bunten Reihe“ (KBR):** zur Unterscheidung von *Enterobacteriaceae* anhand deren Enzymausstattung durch eine festgelegte Reihenfolge von Basismedien mit Indikatoren (Kligler, Ornithin-Decarboxylase-Test, Lysin-Decarboxylase-Test, Indol, Urease, Citrat, Glucose, Rhamnose)<sup>(46)</sup>.
- **Identifikation mit API 20E:** API 20E liegt dasselbe Prinzip wie der kurzen bunten Reihe zugrunde. Es werden *Enterobacteriaceae* und andere gramnegative Stäbchen weiter differenziert, indem man vorgefertigte Substrate in 20 Mikroröhrchen mit einer Suspension des zu identifizierenden Keimes beimpft. Die Verwendung erfolgte nach Anweisung des Herstellers bio mérieux.



Abb.3.1: Beispiel einer API 20E

- **Identifikation mit BBL Crystal:** Erweiterte Mikroversion der kurzen bunten Reihe zur Differenzierung von diversen Keimen, die in jeweils einer Version für gramnegative und grampositive Organismen vorliegt. Es wird eine Keimsuspension hergestellt, die in eine Abfolge von 30 Mikropanels mit getrockneten Substraten und Indikatoren gegeben wird. Die Verwendung erfolgte nach Anweisung des Herstellers Becton Dickinson S.A.

### 3.3.3 Identifikation durch Resistenzbestimmung

Bei dieser Identifikationsmethode wird der zu bestimmende Keim anhand seiner Resistenzlage gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmt, wobei die Größe des

bakterienfreien Hemmhofes um die Antibiotika-Plättchen Auskunft darüber gibt. In der vorliegenden Arbeit wurden durch diese Methode Enterokokkenspezies unterschieden. Für die Resistenzbestimmung wurde der zu bestimmende Keim mit einer sterilen Öse von der Agarplatte abgenommen und in TSB-Bouillon (Tryptic Soy Broth) gelöst. Nach Durchmischung wurden 2 Tropfen gleichmäßig auf einem Müller-Hinton-Agar verteilt. Vor der Bebrütung bei 37°C wurden mit speziellen Stempeln verschiedene Antibiotika-Testplättchen in gleichmäßigen Abständen darauf verteilt <sup>(46)</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden pro zu untersuchendem Keim je zwei Agarplatten beimpft und mit je einer Antibiotikagruppe versehen. Die Enterokokken konnten anhand folgender Resistenzlage zugeordnet werden:

Tabelle 3.2: Überblick der Resistenzlage von *Enterococcus faecium* und *faecalis*.

Antibiotikum	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Vancomycin	sensibel	sensibel
Fosfomycin	variabel	variabel
Clindamycin	resistent	resistent
Ampicillin	resistent	sensibel
Tetrazyklin	sensibel	resistent
Amoxicillin/Clavulansäure	resistent	sensibel
Ampicillin/Sulbactam	resistent	sensibel
Sulfamethoxacol/Trimetophrim	resistent	sensibel

### 3.3.4 DNA-Extraktionsmethoden

- **KOH-Lyse:** 1 Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Öse in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit 50µl Aqua dest. (Braun) und 50µl Lysis Solution (Wasser, KOH 5M, EDTA 0,5M und Dithiotreitol 1M; pH von 14), Inkubation im Heizblock bei 95°C für 15min. Anschließend Zugabe von 8µl Neutralisationslösung (HCl 1M und Tris/HCl 1M). Zentrifugation bei 13.000 UpM für 2 Minuten, anschließend befindet sich die DNA im Überstand.
- **Qiagen Mini Stool Kit®:** Extraktionsmethode speziell zur Aufbereitung von bakterieller DNA aus Stuhl, bei der zusätzlich im Stuhl vorhandene Hemmstoffe

der PCR beseitigt werden. Die Methode wurde nach Anweisung des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwendet.

### 3.3.5 Materialien für die Durchführung der PCR

Gemäß der geplanten Anzahl an PCRs wurden Mastermixe erstellt und à 95µl in autoklavierte 0,2ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Rezeptur pro Reaktion: 10µl Domann-Puffer, 4µl dNTP-Mix 1,25mM, je 0,2µl Primer F und Primer R, 0,3µl Taq-Polymerase 500U, 80,3µl Aqua dest. steril. Domann-Puffer: Tris/HCl 1 M (10ml), MgCl<sub>2</sub> 1M (1ml), KCl 1M (12,5ml), 10% Tween20 (2,5ml), Gelatine (5ml), destilliertes Wasser (19ml). Der fertige Mastermix wurde bei -18°C bis zur Verwendung gelagert und vor Verwendung auf Eis aufgetaut. Pro Reaktion wurden 5µl DNA zugefügt.

Folgende Primer, die in der V6-V8 Region der 16S r-DNA binden, wurden verwendet:

#### P9-Primerpaar (1009 bp):

101 F: 5'-AGT GGC GGA CGG GTG AGT-3'

1110 R: 3'-TGC GCT CGT TGC GGG ACT TAA C-5'

#### c-Primerpaar (474 bp):

933 F: 5'-GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G-3'

1407 R: 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA G-3'

Die PCR wurde mithilfe des Geräts Gene Amp PCR-System 9700 von Applied Biosystems durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 100µl.

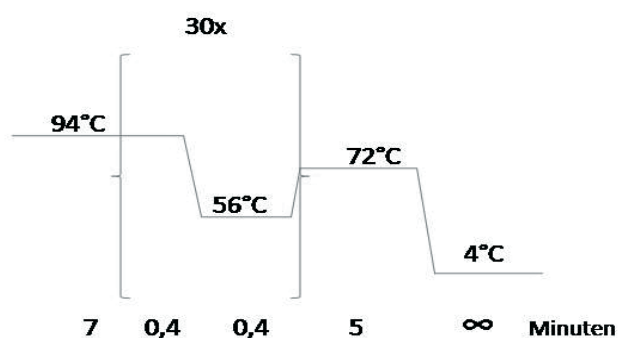


Abb. 3.2: PCR-Programm im Gene Amp PCR-System 9700 von Applied Biosystems

Für Proben mit sehr schwachem Signal in der Gelelektrophorese, wie Mekonium und ausgewählte Trachealsekrete, wurde eine erneute PCR mit dem piko<sup>®</sup> Thermal Cycler durchgeführt. Dieser ermöglicht eine spezifischere und schnellere PCR. Dies wird zum einen aufgrund der *Pyrococcus*-DNA-Polymerase gewährleistet, die der herkömmlichen *Thermophilus aquaticus*-Polymerase in Bezug auf Elongationszeit, Ausbeute und Genauigkeit überlegen ist. Zum anderen werden ultradünne Reaktionsgefäße verwendet, die die Aufheizungs- und Abkühlungsphasen deutlich verkürzen. Die Mastermixe wurden unmittelbar vor der PCR erstellt mit einem Gesamtvolumen von 50µl je Reaktion, bestehend aus 25µl Phusion<sup>™</sup> Mix 2x, je 0,25µl Primer F und Primer R, 20,5µl steriles Aqua dest. sowie 4µl DNA. Folgendes Programm wurde verwendet:

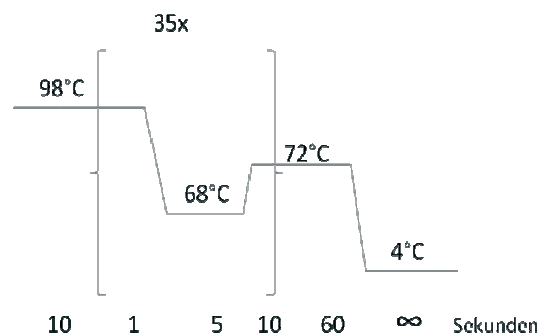


Abb. 3.3: PCR-Programm des piko<sup>®</sup> Thermal Cycler

### 3.3.6 Agarose-Gel und Gelelektrophorese

Für die Darstellung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1,3 %igen Agarosegel durchgeführt. Zur Herstellung eines Agarose-Gels für die Gelelektrophorese wurden 5,2g Agarose verwendet, sowie 400ml TBE-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan 89mM, Borsäure 2mM und EDTA-Na<sub>2</sub> 89mM), in zehnfacher Verdünnung mit destilliertem Wasser. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer in einer Konzentration von 1:10 eingesetzt. Der Auftragspuffer für die Proben wurde aus 1,25g Ficoll<sup>®</sup> (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) in 7,5ml destilliertem Wasser hergestellt und über Nacht im Kühlschrank gelöst, anschließend wurde eine Spatelspitze Bromphenolblau hinzugefügt, dann 10:1 mit SYBR<sup>®</sup>Gold (1:100 mit DMSO (Dimethylsulfoxid) verdünnt) versetzt. Zur Orientierung wurde DNA-Marker (s.u.) verwendet.

### 3.3.7 DNA-Aufreinigung und Sequenzierung

Amplifikate, die in der Gelelektrophorese ein positives Signal zeigten, wurden zur Sequenzierung in eine Mikrotiterplatte übertragen, auf deren Boden sich eine Membran befand. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Platte abgedeckt, über eine Vakuumpumpe wurde die Flüssigkeit 5 Minuten durch die Membran abgesogen. Die DNA lag anschliessend der Membran auf. Nachdem 100µl Licrosolv (gereinigtes nukleotidfreies Wasser) zugegeben wurden, wurde der Vorgang wiederholt. Durch diese Filterung wurden überschüssige Primer sowie die Taq-Polymerase aus der Probe herausgefiltert, um ein gutes Sequenzierergebnis zu erzielen. Anschliessend wurde die DNA mit 50µl Licrosolv aus der Membran eluiert, indem die Platte fünf Minuten auf einem Schüttler bewegt wurde. Die Sequenzierung erfolgte innerhalb des Instituts mit dem MegaBACE 1000 nach Anweisungen des Herstellers.

Da während dieser Doktorarbeit das Sequenzierverfahren auf einen externen Anbieter (AGOWA, Berlin) umgestellt wurde, erfolgte die Aufreinigung nach der Umstellung mit dem QIAquick PCR Purification Kit<sup>®</sup> nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde die DNA mit 30µl sterilem destilliertem Wasser in 5 min Inkubationszeit, statt nach Herstellerangaben mit 50µl EB-Puffer in 1min. Anschließend wurde die Konzentration mit dem NanoDrop<sup>®</sup> gemessen und ggf. für die Sequenzierung verdünnt.

### 3.3.8 Überblick über die verwendeten Chemikalien und Geräte

Agarose: Invitrogen, UK

Antibiotika-Stempel und Plättchen: Becton Dickinson

Aqua dest.: Braun

DHPLC: Transgenomic 3500 HT WAVE<sup>®</sup> DHPLC System inkl. fragment collector

DHPLC Puffer: Transgenomic

Digitale Gel-Dokumentation: Biorad Universal Hood II

DNA-Marker: Molecular Weight Marker von Boehringer oder Roche

Ficoll: Ficoll<sup>™</sup>400 Amersham Pharmacia Biotech AB

Image Master VDS-System: Amersham Biosciences

InvαF' chemisch kompetente Zellen: Invitrogen

MegaBACE 1000: Molecular Dynamics-Amersham Biosciences

NaCl 0,9%: Braun

NanoDrop: Nano Drop Technologies Inc.

NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Isolierung: Macherey-Nagel, Düren

Nukleotide: Fermentas GmbH

Phusion<sup>™</sup> Flash PCR Master Mix: Finnzymes

Piko<sup>®</sup> Thermal Cycler: Finnzymes

Primer: Metabion

Qiagen QIAquick PCR Purification Kit: Qiagen

Reaktionsgefäße: Eppendorf

Stool Kit: Qiagen

SYBR<sup>®</sup> Gold: Molecular Probes

Taq-Polymerase: Invitrogen

Tissue Kit: Invitex

TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit mit pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>: Invitrogen

Tween20: Merck

UTW 8 Tube Stripes Finnzymes

Vortexer: Janke & Kunkel

Zentrifuge: Heraeus Biofuge pico 13000

## **3.4 Methoden**

### **3.4.1 Probengewinnung**

Proben von Mekonium und Stuhl wurden durch das Pflegepersonal der Intensivstation bzw. der Station Moro aus der Windel der Frühgeborenen mit einem kleinen, zum Probenset gehörenden Löffel entnommen und in ein Stuhlröhrchen gegeben. Trachealsekret wurde während der routinemäßig durchgeführten Bronchialpflege bei beatmeten Kindern entnommen, indem es aus dem Auffangbehälter in ein Sputumröhrchen transferiert wurde. Anschließend wurden die Proben bis zur Abholung im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt.

### 3.4.2 Verarbeitung der Proben

Jeweils 1g Mekonium oder Stuhl wurden jeweils mit 1ml NaCl 0,9% versetzt und für eine Minute - bei Mekonium drei Minuten – gevortext, um das Gemisch zu homogenisieren.

Anschließend wurden jeweils 10µl der Proben mit einer sterilen Öse auf Blut-, MacConkey- und Schaedler-Agar fraktioniert ausgestrichen.

Zur molekularen Diagnostik wurde homogenisiertes Mekonium oder Stuhl mit dem Qiagen Mini-Stoolkit nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Von dem erhaltenen Extrakt wurden 5µl in c-Masternmix (Primer 933F/1407R) eingesetzt und amplifiziert. Nach der PCR wurde das Amplifikat auf ein Agarosegel zur Gelelektrophorese aufgetragen. Anschließend wurden die Amplifikate mit der DHPLC analysiert.

Der Blut- und MacConkeyagar wurde 24h bei 37°C unter aeroben Bedingungen und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Kulturen von MacConkey wurden biochemisch weiter differenziert. Bakterienkulturen auf den Blutagarplatten wurden, soweit möglich, phänotypisch bestimmt, anschließend biochemisch weiter differenziert. Die Resistenzbestimmung wurde darüber hinaus vereinzelt zur weiteren Differenzierung zwischen *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* herangezogen. Bei Unklarheit oder ungenauem Ergebnis wurde zur Differenzierung Molekulardiagnostik eingesetzt, d.h. Extraktion, Amplifikation, Sequenzierung und Bioinformatik.

Schaedleragar wurde 10 Tage unter anaeroben Bedingungen bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Anschließend wurde aufgrund der rasenartigen Keimverteilung mit einer Öse Mischkulturen entnommen, mit KOH-Lyse extrahiert, amplifiziert und mit PCR/DHPLC analysiert. In Einzelfällen wurden einzelne Bakterienkolonien molekulardiagnostisch über Extraktion, Amplifikation mit P9-Primer (101F/1110R) und Sequenzierung identifiziert, besonders bei kulturpositivem Mekonium.

Trachealsekret wurde mit einer 10µl Öse auf Kochblut-, MacConkey- und Schaedler-Agar fraktioniert ausgestrichen und unter denselben Bedingungen wie Stuhl bebrütet. Die Vorgehensweise bei Bakterienwachstum entsprach der von Stuhl und Mekonium.

Zur molekularen Untersuchung wurde das Trachealsekret in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt, 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend 250µl Überstand



entnommen. Dieser wurde mit KOH-Lyse extrahiert, mit c-Primer amplifiziert und mit PCR/DHPLC analysiert.

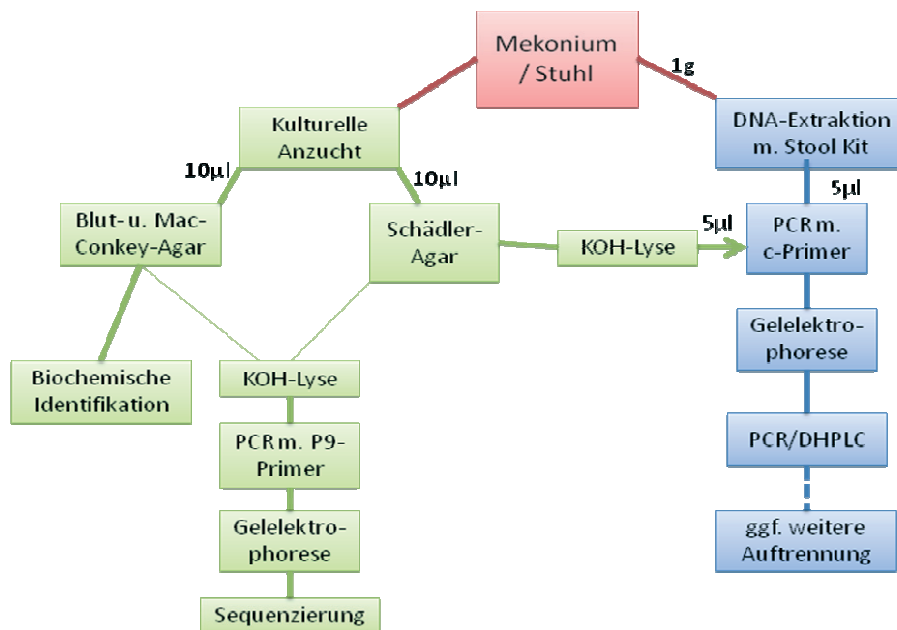


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für Mekonium- und Stuhlproben

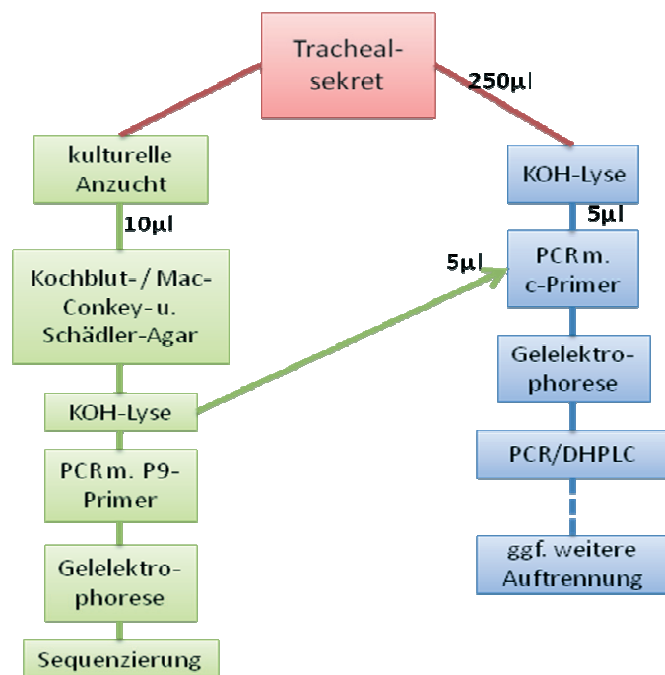


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für Trachealsekret

### 3.4.3 Molekulare Identifikation

Wie bereits beschrieben, wurde für die vorliegende Doktorarbeit die 16S rDNA aus der kleinen ribosomalen Untereinheit der Bakterien verwendet. Die V6-V8 Region der 16S-rDNA, die eine Region mit 54% hochkonservierten und 46% hypervariablen Sequenzen umfasst, wurde bereits für die PCR/DHPLC als geeigneter Bereich zur Untersuchung polymikrobieller Gemeinschaften ausgewählt <sup>(24)</sup>. Für die Amplifikation der Proben, die für die PCR/DHPLC vorgesehen waren, wurde das c-Primerpaar (933F/1407R) gewählt, welches bereits von Domann et al. verwendet wurde. Das in der hiesigen Routinediagnostik gebräuchliche Primerpaar P9 (101F/1110R) wurde zur Sequenzierung von DNA aus Bakterienkolonien eingesetzt, um angezüchtete Bakterien bestimmen zu können. Für die PCR wurden jeweils 5µl der DNA-Extrakte für die konventionelle Technik verwendet, 4µl für den piko<sup>®</sup> Thermal Cycler. Mit dem piko<sup>®</sup> Thermal Cycler wurden aufgrund der größeren Sensitivität sowohl die Mekoniumproben als auch einzelne Trachealsekrete amplifiziert, wenn die konventionelle PCR kein Ergebnis zeigte. Bei der konventionellen PCR wurden üblicherweise 25 Zyklen durchgeführt, für die Amplifizierung der einzelnen Fraktionen nach Sammellauf der DHPLC (s.u.) 30 Zyklen. Als Positivkontrolle wurde für beide PCR-Methoden ein DNA-Extrakt (KOH-Lyse) aus *E.coli* verwendet, als Negativkontrolle sterilisiertes destilliertes Wasser. Für die nach der Amplifikation durchgeführte Gelelektrophorese wurde 5µl DNA-Marker eingesetzt. Ferner wurden pro 5µl aufgetragenem Amplifikat 5µl Auftragspuffer zugegeben und die Elektrophorese für 1 Stunde bei 150V durchgeführt.

Alle Proben aus Originalmaterial (Mekonium, Stuhl und Trachealsekret) wurden mit der PCR/DHPLC analysiert. Dazu kamen die Mischkulturen von Schaedleragar. Ausgewählte Proben wurden in einem zweiten Durchlauf fraktioniert gesammelt (s.u.).

Zur Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet. Dazu wurden die vom MegaBACE oder AGOWA ausgegebenen Sequenzen mit dem Programm SeqMan (DNA-Star Inc., Madison, Wisconsin USA) ausgewählt und auf obiger Seite eingegeben, anschließend über den Algorithmus „Blastn“ und der Qualität „Megablast“

mit der Datenbank verglichen. Das Programm gibt den Prozentsatz der Übereinstimmung zwischen der Vorlage und der DNA aus der Datenbank an. Für die vorliegende Arbeit wurden nur die Blastergebnisse gewertet, die eine Übereinstimmung mit der Datenbank-DNA von mindestens 96% zeigten. Lagen mehrere Bakterienspezies mit demselben Prozentsatz an Übereinstimmung und demselben Score vor, wurde auf die Bakteriengattung zurückgegriffen. Zur weiteren Überprüfung bei unklaren Ergebnissen wurde die Datenbank von sepsiblast<sup>®</sup> verwendet ([www.sepsitest-blast.de](http://www.sepsitest-blast.de)).

### 3.4.4 Klonierung

Das erste untersuchte Mekonium zeigte nach herkömmlicher PCR (PCR-Programm s. Abb. 3.2) eine schwache Bande in der Gelelektrophorese, erzeugte jedoch in der DHPLC keinen Peak. Unter der Annahme, dass die DNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegen könnte, wurde zur Vermehrung des Amplifikats eine Klonierung mit dem TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit mit pCR 2.1-TOPO<sup>®</sup> durchgeführt.

Hierzu wurden 2µl Amplifikat nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Während dieses mehrschrittigen Prozesses wurde das Amplifikat in das Plasmid eingebaut und anschließend das Plasmid von chemisch kompetenten INVαF<sup>+</sup> *E.coli*-Bakterien (Invitrogen) aufgenommen (Transformation). Nach einer einstündigen Inkubationsphase in SOC-Medium bei 37°C, bei der sich die Bakterien vermehrten, wurden diese auf LB-Agarplatten mit dem Indikator X-Gal und 100ng/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank aufbewahrt. Das Plasmid (Vektor) enthält eine Ampicillin-Resistenz, d.h. auf der Agarplatte konnten nur Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Darüberhinaus sitzt die Insertbindungsstelle des Amplifikats im Bereich des β-Galaktosidase-Gens, d.h. bei Insertion des Amplifikats in das Plasmid wird die Produktion des kodierten Enzyms gestört. Der Indikator X-Gal ermöglicht den Nachweis einer stattgefundenen Insertion über eine Färbung: Der Indikator färbt sich bei einer Spaltung durch β-Galaktosidase blau, d.h. nur die farblosen Kolonien enthalten das Amplifikat. Es wurden insgesamt 12 angezüchtete Klone mit dem Primerpaar M100/M101 amplifiziert (PCR-Programm s. Abb. 3.2). Drei Klone zeigten in der anschließenden Gelelektrophorese deutliche Banden, einer von ihnen wurde mit der

NucleoSpin® Plasmid-Isolierung nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und sequenziert.

**Primerpaar M100/M101 (entsprechend M13 F u. R von invitrogen):**

M100 (F): 5'- GTA AAA ACG ACG GCC AG – 3'

M101 (R): 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'

**3.4.5 PCR/DHPLC**

Die WAVE®-Technologie von Transgenomic wurde ursprünglich für die sequenzabhängige DNA-Fragment- sowie zur Mutationsanalyse entwickelt. DNA-Fragmente werden der Sequenz nach vollautomatisch getrennt. Prinzipiell handelt es sich um eine „denaturing high-performance liquid chromatography“ (DHPLC), genauer um eine „ion-pair reverse-phase liquid chromatography“ (IP-RP-HPLC). In Zusammenarbeit mit Transgenomic wurde am Institut für Mikrobiologie in Gießen das Programm für Mutationsanalyse so modifiziert, dass man kulturunabhängig polymikrobielle Gemeinschaften nachweisen kann, indem man bakterielle DNA-Fragmente gleicher Länge sequenzabhängig trennt <sup>(24)</sup>.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich um eine DHPLC mit einer flüssigen Phase aus Puffer A und Puffer B, sowie einer festen Phase, der Säule. Die Proben werden in einen Puffer-Gradienten aufgenommen und über die Säule geleitet, in der konstante Temperaturbedingungen herrschen. Puffer A besteht aus 0,1M Triethylammoniumacetat (TEAA), einem Brückenmolekül zwischen DNA und Säule (s.u.). Bei Puffer B handelt es sich um ein Gemisch aus 0,1M TEAA und 25% Acetonitril, welches für die Elution der DNA von der Säule genutzt wird. Bevor eine Analyse durchgeführt wird, muss die Säule mit Puffer C (25% H<sub>2</sub>O, 75% Acetonitril) gewaschen werden, um eventuell noch vorhandene DNA-Reste zu eliminieren.

Die Säule besteht aus non-porous poly (styrene-divinylbenzene) copolymers. Durch den kleinen Durchmesser der einzelnen Partikel (2,1 +/- 0,12µm) besitzt die Säule eine insgesamt sehr grosse Oberfläche, die eine schnelle Auftrennung garantiert.

Bei der Auftrennung der DNA macht man sich die Tatsache zunutze, dass DNA eine negative Ladung besitzt, während sich die Säule elektrisch neutral verhält. Die DNA

kann also nur über TEAA an die Säule gebunden werden, durch Acetonitril wird diese Bindung gelöst.



Abb. 3.6: Molekulares Funktionsprinzip der WAVE®-Technologie. Das TEAA-Molekül stellt eine Verbindung zwischen der negativ geladenen DNA und der neutralen Säule her (Quelle: Transgenomic)

Ein weiterer Aspekt, der zur Auftrennung genutzt wird, ist die Tatsache, dass GC-reiche DNA früher eluiert, was man sich für die Auftrennung gleich langer DNA-Fragmente nach der Sequenz zunutze machen kann. Das Ergebnis erscheint anschließend als Chromatogramm, mit der Retentionszeit auf der x-Achse und der Absorption in mV auf der y-Achse, entsprechend der DNA-Menge.

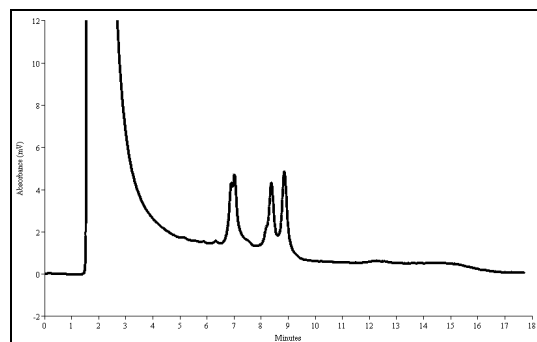


Abb. 3.7: Beispiel eines Chromatogramms, auf der x-Achse wird die Retentionszeit, auf der y-Achse die Absorption in mV, entsprechend der DNA-Menge, angezeigt.

Für die vorliegende Arbeit wurde der für die Analyse von polymikrobiellen Gemeinschaften entwickelte Puffergradient „mixed species 1st60 new“ und die optimale Ofentemperatur von 62°C verwendet<sup>(24)</sup>. Das Injektionsvolumen betrug 20µl. Zunächst wurde die Säule mit Puffer C gewaschen, wobei DNA-Reste entfernt wurden. Die Proben wurden in eine 96well Platte pipettiert und in den kühlenden Autosampler gestellt. Die Proben wurden einzeln aufgenommen und über die Säule gespült, wobei

sie durch Puffer A gebunden wurden. Anschließend stieg die Konzentration von Puffer B zunehmend an, und die DNA wurde je nach Festigkeit der Bindung an die Säule heruntergespült. Mit einer UV-Lampe wurde die Absorption des Eluats bestimmt und die Daten an den angeschlossenen Computer gesendet, der daraus ein Chromatogramm erstellte. Dieses besteht aus einem initialen hohen und breiten Elutionspeak, der in der Phase der Auswaschung der Chromatographiesäule entsteht <sup>(24)</sup>, sowie den anschließenden Peaks aus bakterieller DNA.

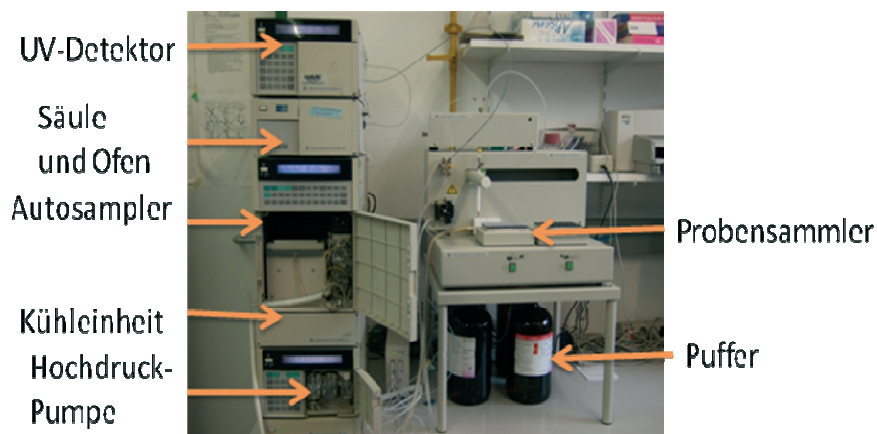


Abb. 3.8: Komponenten der DHPLC. Gezeigt werden UV-Detektor, Säule, Ofen, Autosampler, Kühleinheit, Hochdruckpumpe, Probensammler und Puffer.

Um die DNA der einzelnen Peaks zu trennen und einem bestimmten Bakterium zuzuordnen, wurde in einem zweiten Durchlauf derselben Probe (Sammellauf) das Eluat während der Eluierung der DNA von der Säule in festgelegten Schritten in einer 96-well Platte aufgefangen. Hierzu wurden am Computer anhand des bereits vorliegenden Chromatogramms Anzahl und Breite der Sammelschritte entlang der x-Achse festgelegt, so dass die einzelnen Peaks möglichst in separaten Wells aufgefangen wurden.

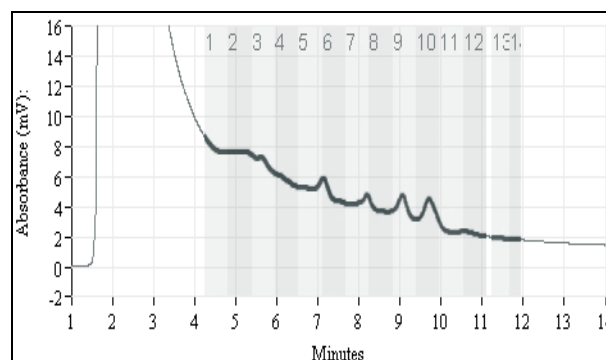


Abb. 3.9: Beispiel für die Einteilung eines Chromatogramms für eine Auftrennung (Sammellauf). Gezeigt ist ein Chromatogramm mit der Retentionszeit auf der x-Achse und der Absorption in mV auf der y-Achse, das in 30s-Schritte eingeteilt wurde. Dabei wird jeder markierte Abschnitt in einem neuen Well aufgefangen.

Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen in den Wells erneut amplifiziert und sequenziert. Über die bioinformatische Analyse konnten die Peaks einer Bakterien-gattung oder –spezies zugeordnet werden.

### 3.5 Extraktion von DNA aus Mekonium

Zum Nachweis der Eignung des Qiagen Stool Kit<sup>®</sup> für die DNA-Extraktion aus Mekonium wurde dieses gegen DNeasy Tissue Kit<sup>®</sup> getestet. Dazu wurde eine Mekoniumprobe mit *E. coli* beimpft und mit beiden Methoden wurde die bakterielle DNA gemäß Protokoll der Hersteller aus dem Mekonium extrahiert und amplifiziert. Die Eignung der Methode zeigte sich in der Gelelektrophorese sowie einer DNA-Konzentrationsmessung mit dem NanoDrop<sup>®</sup>.

### 3.6 Standardkurven für PCR/DHPLC mit konventioneller PCR und Piko<sup>®</sup> Thermal Cycler

Die Standardkurven für die PCR/DHPLC in Verbindung sowohl mit dem konventionellen, hier verwendeten PCR-Gerät und dem Piko<sup>®</sup> Thermal Cycler lagen bereits aus früheren Untersuchungen im Institut vor. Dabei zeigte die PCR/DHPLC mit konventioneller PCR eine Nachweisgrenze von ca. 9.000 CFU/ml im Ausgangsmaterial, in Verbindung mit dem Piko<sup>®</sup> Thermal Cycler eine Nachweisgrenze von ca. 5-10 CFU/ml (24, 84).

### 3.7 Statistische Methoden

Die Berechnungen der Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler wurden mit Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Extraktion von DNA aus Mekonium

Aufgrund der zähen Konsistenz von Mekonium wurden zur Wahl der geeigneten Extraktionsmethode zunächst Qiagen Mini Stool Kit<sup>®</sup> und DNeasy Tissue Kit<sup>®</sup> miteinander verglichen, im Hinblick auf die Kriterien DNA-Konzentration nach PCR sowie Amplitude in der DHPLC (s. 3.5). In der Gelelektrophorese war das Signal des Amplifikats aus dem Stool Kit stärker als das aus dem Tissue Kit. Auch die Messung der DNA-Konzentration in den Amplifikaten mittels NanoDrop<sup>®</sup> zeigte im Amplifikat aus dem Stool Kit eine höhere DNA-Konzentration. Dasselbe Amplifikat zeigte im Vergleich in der DHPLC eine doppelt so hohe Amplitude wie das aus Tissue Kit.

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der mit dem NanoDrop<sup>®</sup> gemessenen DNA-Konzentration. Gezeigt sind DNA-Konzentration und Reinheitsgrad der PCR-Produkte beider Untersuchungsreihen, gemessen mit dem NanoDrop. Das PCR-Produkt, das mit Stool Kit extrahiert wurde, zeigte eine höhere DNA-Konzentration bei vergleichbarer Reinheit.

	Qiagen Mini Stool Kit	DNeasy Tissue Kit
<b>DNA-Konzentration</b>	107ng/μl	95,5ng/μl
<b>Reinheitsgrad OD 260/280</b>	1,91	1,93

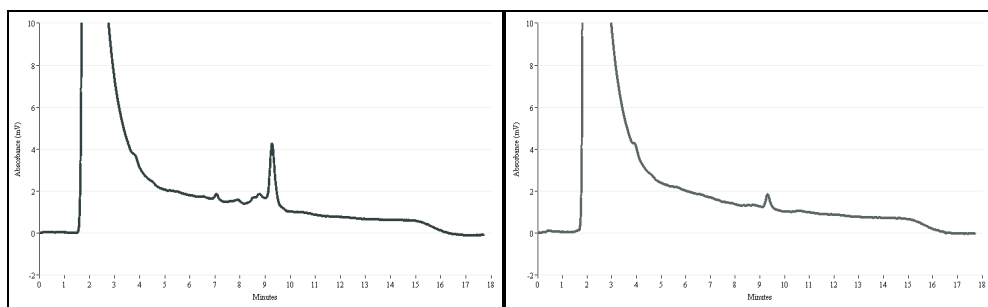


Abb. 4.1: Darstellung zur Eignung der Extraktionsmethode von Mekonium mittels DHPLC. Links nach DNA-Extraktion mit Qiagen Mini Stool Kit<sup>®</sup>, rechts mit DNeasy Tissue Kit<sup>®</sup>



## 4.2 Untersuchung von Trachealsekret

Von 25 Kindern waren insgesamt 16 beatmet, von 12 Kindern lag Trachealsekret vor. Von Kind 9 und 10 wurde täglich Trachealsekret über neun und sieben Tage gesammelt, von den übrigen zehn Kindern lag vereinzelt Material vor. Die meisten Proben stammten vom zweiten und dritten Lebenstag. Die durchschnittliche Beatmungsdauer betrug 7,2 Tage ( $\pm 5,98$  Tage), bei zwei Kindern war die genaue Beatmungsdauer nicht bekannt. Im Durchschnitt wurden pro Kind 2,75 Proben ( $\pm 2,63$ ) gesammelt, insgesamt lagen 33 Proben vor. Bei 23 Kindern (92%) lag ein Atemnotsyndrom vor, wovon 57% Grad III oder höher erreichten. Nur bei einem Kind (Kind Nr. 9) lag ein Atemnotsyndrom IV° vor. Sechs der insgesamt 25 Kinder entwickelten eine bronchopulmonäre Dysplasie, wobei deren Gestationsalter unterhalb von 29+0 Wochen lag.

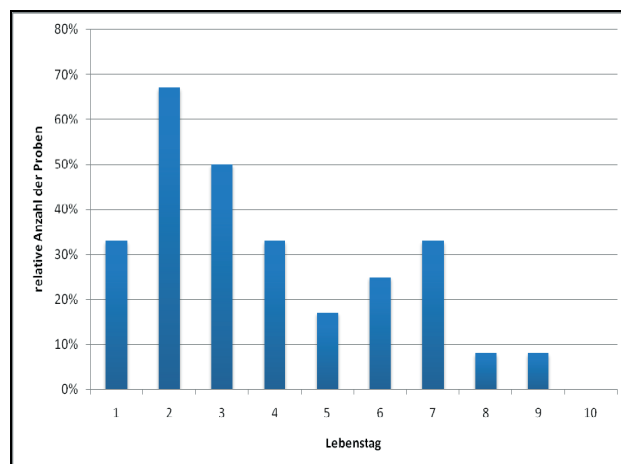


Abb. 4.2: Relative Anzahl der vorliegenden Trachealsekrete. Gezeigt wird die relative Anzahl der Trachealsekrete an den einzelnen Lebenstagen. Auf der x-Achse befinden sich die Lebenstage, auf der y-Achse die relative Anzahl der Proben in %, bezogen auf 12 beatmete Kinder.

Bei einem Kind (Kind Nr. 9, Probe 1) wuchsen einzelne Bakterienkolonien auf Schaedleragar. Über eine Sequenzierung wurden die Bakterienkulturen als *Bacillus sp.* identifiziert. Zusätzlich wurde mit den DNA-Extrakten aus den einzelnen Bakterienkolonien eine PCR mit c-Mastermix durchgeführt, die Amplifikate mit der DHPLC analysiert und anschließend sequenziert.

Alle DNA-Extrakte aus Trachealsekret wurden mit PCR amplifiziert, wobei sich bei vier kulturnegativen Proben ein Signal in der Gelelektrophorese zeigte. Bei drei Proben (Kind Nr. 8, Probe 1; Kind 10, Probe 3; Kind Nr. 17, Probe 2) waren diese schwach ausgeprägt, die dritte (Kind Nr. 22, Probe 1) trat deutlicher hervor. Die beiden erstgenannten Proben wiesen in der DHPLC niedrigamplitudige Peaks auf (Amplitude <1mV), die dritte Probe hingegen zeigte Peaks mittlerer Amplitude.

Von dem kulturpositiven Trachealsekret (Kind Nr. 9, Probe 1) sowie von drei kulturnegativen Proben mit Generierung eines Peaks in der DHPLC (Kind Nr. 8, Probe 1; Kind 10, Probe 3 und Kind Nr. 22, Probe 1) wurden Sammelläufe mit der DHPLC durch-geführt.

Insgesamt stammten alle vier Proben aus den ersten drei Lebenstagen, davon eine vom Tag der Geburt (Kind Nr. 9, Probe 1), zwei vom zweiten Tag (Kind Nr. 8, Probe 1 und Kind Nr. 22, Probe 1) und eine vom dritten Tag (Kind Nr. 10, Probe 3). Kind Nr. 9 und Nr. 10 (Zwillinge) erhielten zum Zeitpunkt der Probenentnahme Ampicillin, Cefotaxim und Gentamycin. Kind Nr. 8 wurde mit Ampicillin, Cefotaxim und Refobacin behandelt, Kind Nr. 22 erhielt Ampicillin und Cefotaxim. Bei allen vier Kindern lag ein Atemnotsyndrom II° oder höher vor, Kind Nr. 9 war das einzige aller 25 Kinder mit Atemnotsyndrom IV°.

Bei Kind Nr. 9, Probe 1 stimmte das Sequenzierergebnis aus der DHPLC mit dem aus der kulturellen Anzucht überein, bzw. grenzte es noch genauer ein. Die DNA konnte damit einer Bakterienspezies zugeordnet werden (*Bacillus cereus*). Bei Kind Nr. 8 konnte mit der DHPLC *Fusobacterium nucleatum* nachgewiesen werden, bei Kind 10 *Bacillus sp.* und bei Kind 22 *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus*. Insgesamt fanden sich bei allen vier Proben keine Hinweise für eine Mischkultur.

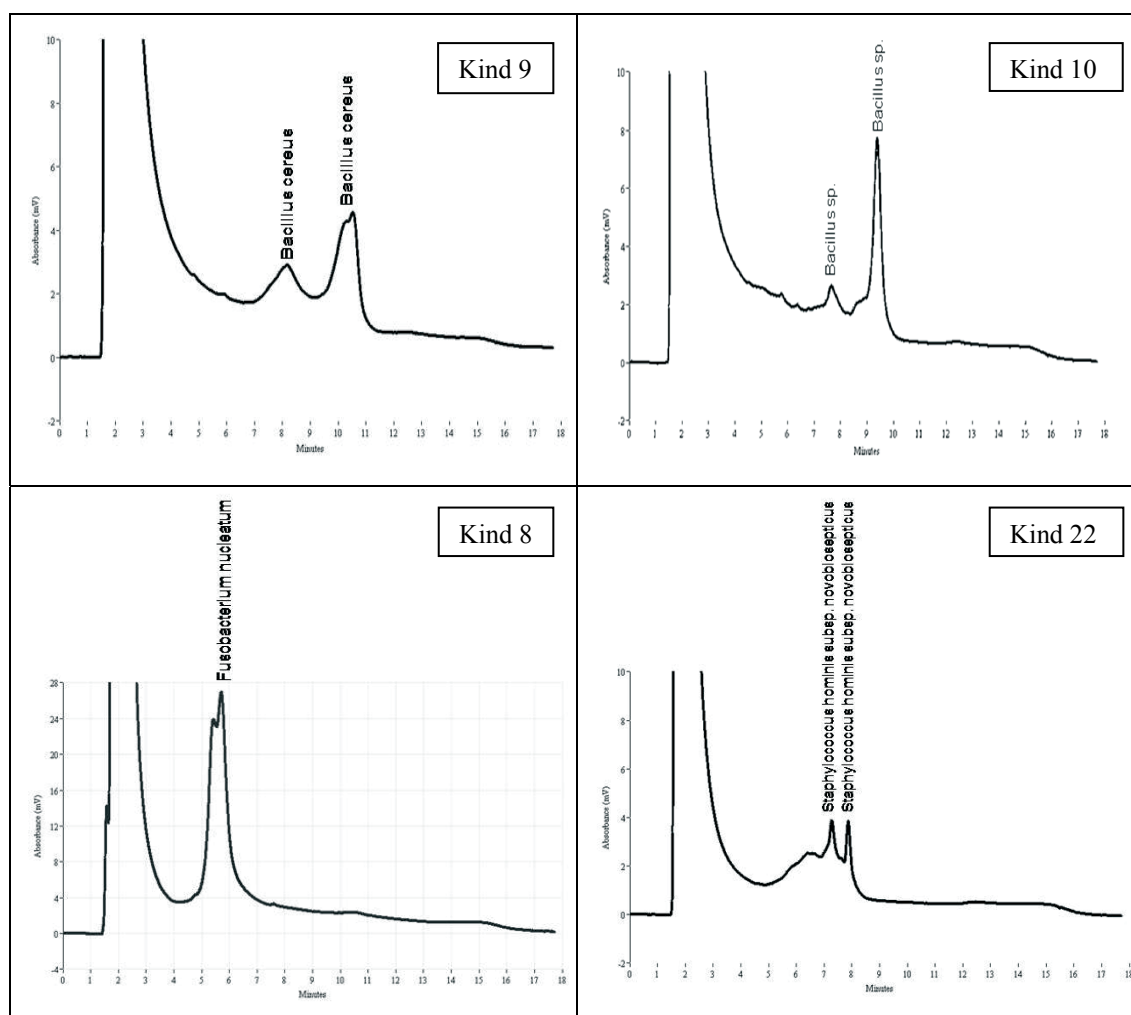


Abb. 4.3: Übersicht über die Sequenziererergebnisse der DHPLC-Peaks von Trachealsekreten. Dargestellt sind die Peaks mit dem jeweiligen Sequenziererergebnis der Kinder Nr. 9, Nr. 10, Nr. 22 und Nr. 8.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse in der Zusammenfassung wie folgt darstellen:

Tabelle 4.2: Übersicht über die im Trachealsekret nachgewiesenen Bakterien.

Kind/Probe	nachgewiesenes Bakterium
Kind 8, Probe 1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Kind 9, Probe 1	<i>Bacillus cereus</i>
Kind 10, Probe 3	<i>Bacillus sp.</i>
Kind 22, Probe 1	<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i>

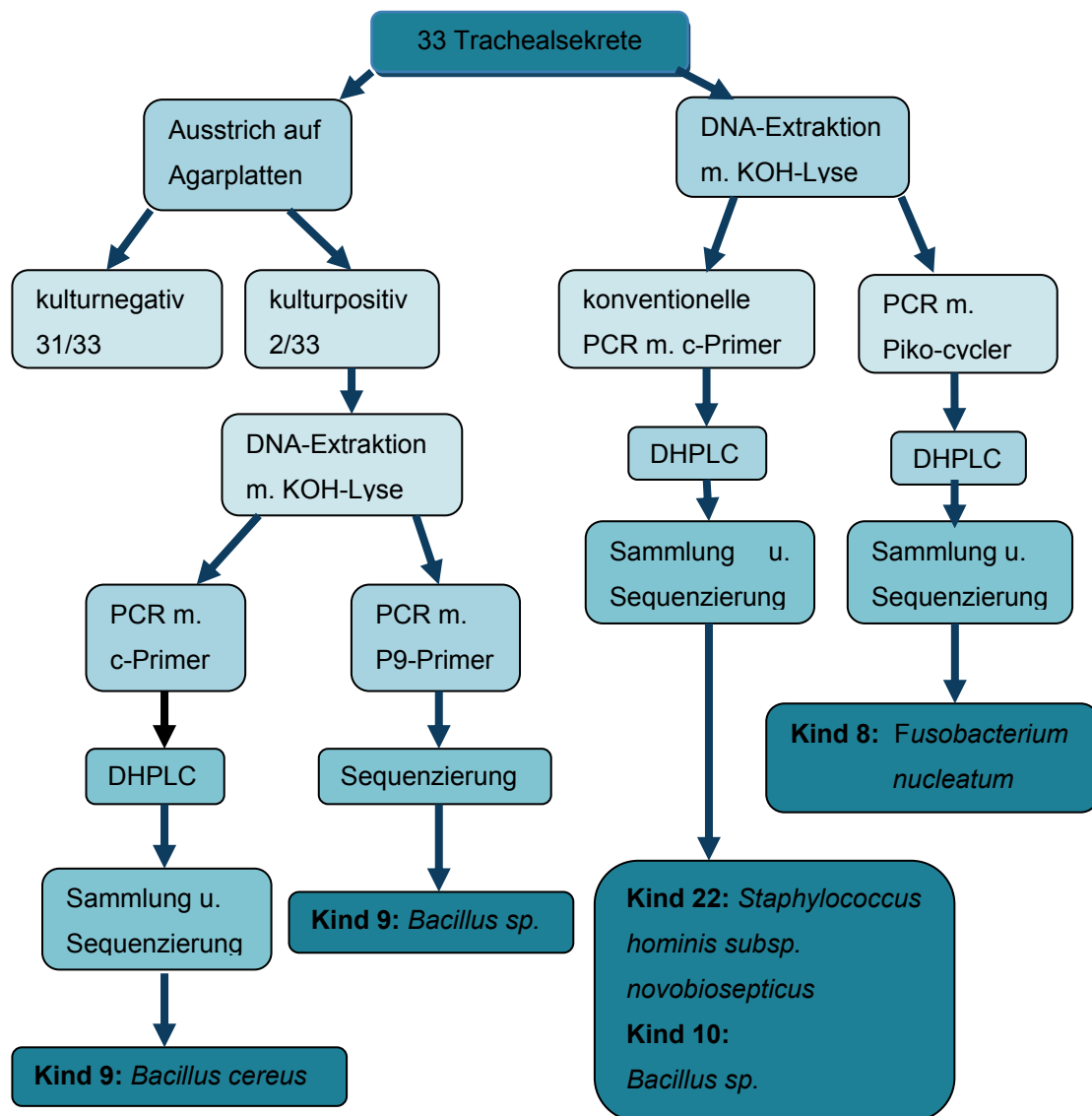


Abb. 4.4: Gesamtübersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen von Trachealsekret

## 4.3 Untersuchung von Mekonium

### 4.3.1 Wachstum auf Agarplatten

Für 18 von 25 Kindern lag Mekonium vor (72%), welches im Durchschnitt 3,3 Tage  $\pm$  2,8 nach Entbindung abgesetzt wurde. Bei fünf von 18 dieser Kinder kam es zu einem Wachstum von Bakterien auf Agarplatten (28%). Das Jüngste dieser fünf Kinder wurde mit einem Gestationsalter von 28+4 Wochen, das Älteste mit 31+1 Wochen geboren, im Mittel lag das Gestationsalter bei 29+3 Wochen ( $\pm$  1 Woche + 0,5 Tage). Das Geburtsgewicht betrug im Durchschnitt 1542g  $\pm$  268,6g. Das Mekonium wurde zwischen dem zweiten und dritten Lebenstag abgesetzt. Die Analyse der Keime erfolgte über eine DNA-Extraktion mit KOH-Lyse, PCR mit P9-Primer und Sequenzierung.

Folgende Keime konnten auf den Kontrollplatten dieser fünf Kinder mit jeweils 1-3 Kolonien angezüchtet werden:

Kind Nr. 6 wies auf einer Schaedler-Platte *Enterococcus faecalis* und *Enterobacter sp.* auf. Klinisch lag der Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom vor, das Kind erhielt Cefotaxim und Gentamycin ab dem Tag der Geburt für zwei Tage, anschließend Ampicillin. Bei der Mutter wurde fünf Tage vor der Geburt *Enterococcus faecalis* im Zer-vikalabstrich nachgewiesen.

Im Mekonium-Ausstrich von Kind Nr. 7 wuchs auf einer Schaedler-Platte *Propionibacterium acnes*. Antibiotisch wurde es mit Ampicillin und Gentamycin ab dem Tag der Geburt für sechs Tage behandelt.

Bei Kind Nr. 9 wuchs auf einer Blutagar-Platte *Achromobacter xylosoxidans*. Es lag außerdem eine konnatale Sepsis bei Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom vor, die Blutkulturen waren negativ. Das Kind erhielt Ampicillin, Gentamycin und Cefotaxim ab dem Tag der Geburt intravenös. Es handelte sich um einen Zwilling, bei dem Bruder (Kind Nr.10) war das Mekonium kulturnegativ.

Bei Kind Nr. 11 lagen im Mekonium *Bacillus licheniformis* und *Paenibacillus lactis* vor, sowohl auf einer Blutagar-Platte (*Bacillus*) und einer Schaedler-Platte (beide). Ampicillin und Gentamycin wurden dem Kind bis zwei Tage nach Geburt intravenös verabreicht, es lag der Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom vor. Die Blutkultur war negativ. Bei dem Kind handelte es sich um einen Drilling (dreieiig), aus dem Mekonium des einen Kindes (Kind Nr. 12) ließ sich kein Keim anzüchten, von dem anderen Kind (Kind Nr. 13) lag kein Mekonium vor.

Bei Kind Nr.16 wuchs *Enterococcus faecium* auf einer Schaedler-Platte. Das Kind erhielt bis drei Tage nach der Geburt Ampicillin und Gentamycin intravenös. Die Blutkultur war negativ.

Bei den Kindern Nr.6 und Nr.16 ließ sich in späteren Stuhlproben ebenfalls *Enterococcus sp.* nachweisen, bei den übrigen Kindern traten die aus dem Mekonium angezüchteten Keime im Verlauf nicht mehr auf.

Tabelle 4.3: Übersicht der aus Mekonium angezüchteten Bakterien. Dargestellt sind die auf Agarplatten angezüchteten Bakterien aus Mekonium.

Kind Nr.	angezüchtetes Bakterium
6	<i>Enterobacter sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
7	<i>Propionibacterium acnes</i>
9	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
11	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Paenibacillus lactis</i>
16	<i>Enterococcus faecium</i>

#### 4.3.2 Analyse von Mekonium durch PCR und PCR/DHPLC

Von jedem Mekonium wurde nach DNA-Extraktion mit Qiagen Mini Stool Kit<sup>®</sup> eine zweiphasige PCR mit dem c-Primerpaar durchgeführt. Bei 12 von 18 Mekoniumproben zeigten sich schwache Signale in der Gelelektrophorese, darunter vier kulturpositive Proben. In der DHPLC war mit keinem der 18 Amplifikate ein Peak generierbar, so dass unter der Annahme einer zu niedrigen DNA-Konzentration sowohl eine Reamplifizierung als auch eine Erhöhung des Injektionsvolumens versucht wurden, die beide nicht zum Auftreten eines Peaks führten. Mit dem Amplifikat von Kind Nr. 3 wurde die

enthaltene DNA durch eine Klonierung vervielfältigt, wodurch sich schließlich ein Peak in der DHPLC generieren ließ. Dieser konnte dem Bakterium *Leuconostoc citreum* zugeordnet werden.

Das Ergebnis bestätigte, dass die Konzentration der DNA in den Amplifikaten zu niedrig war, um einen Peak in der DHPLC zu erzeugen. Daher wurde für die Untersuchung von Mekonium auf die sensitivere und leistungsstärkere PCR mit dem piko<sup>®</sup> Thermal Cycler zurückgegriffen. Alle Mekoniumextrakte wurden erneut mithilfe des piko<sup>®</sup> Thermal Cycler amplifiziert und es zeigten sich bereits in der Gelelektrophorese stärkere Signale als mit der konventionellen PCR-Methode. Die Amplifikate wurden anschließend mithilfe der DHPLC untersucht und es traten in allen Proben Peaks auf.

Von allen fünf kulturpositiven Proben wurden Sammelläufe durchgeführt, um die Ergebnisse mit denen aus der kulturellen Anzucht vergleichen zu können. Darüber hinaus wurden exemplarisch drei kulturnegative Proben mit einem Sammellauf näher untersucht. Dazu wurden alle acht Proben jeweils fraktioniert auf einer 96-Well Platte aufgefangen und die einzelnen Vials anschließend sequenziert.

Bei allen Proben ließen sich Laktokokken und Streptokokken nachweisen, darüber hinaus fanden sich *Fusobacterium nucleatum*, *Enterobacter cloacae* und *Escherichia sp.* (siehe Abb. 4.5). Die Ergebnisse aus den kulturpositiven Proben stimmten nicht mit denen aus den angezüchteten Bakterienkulturen überein, sondern ergänzten das Keimspektrum.

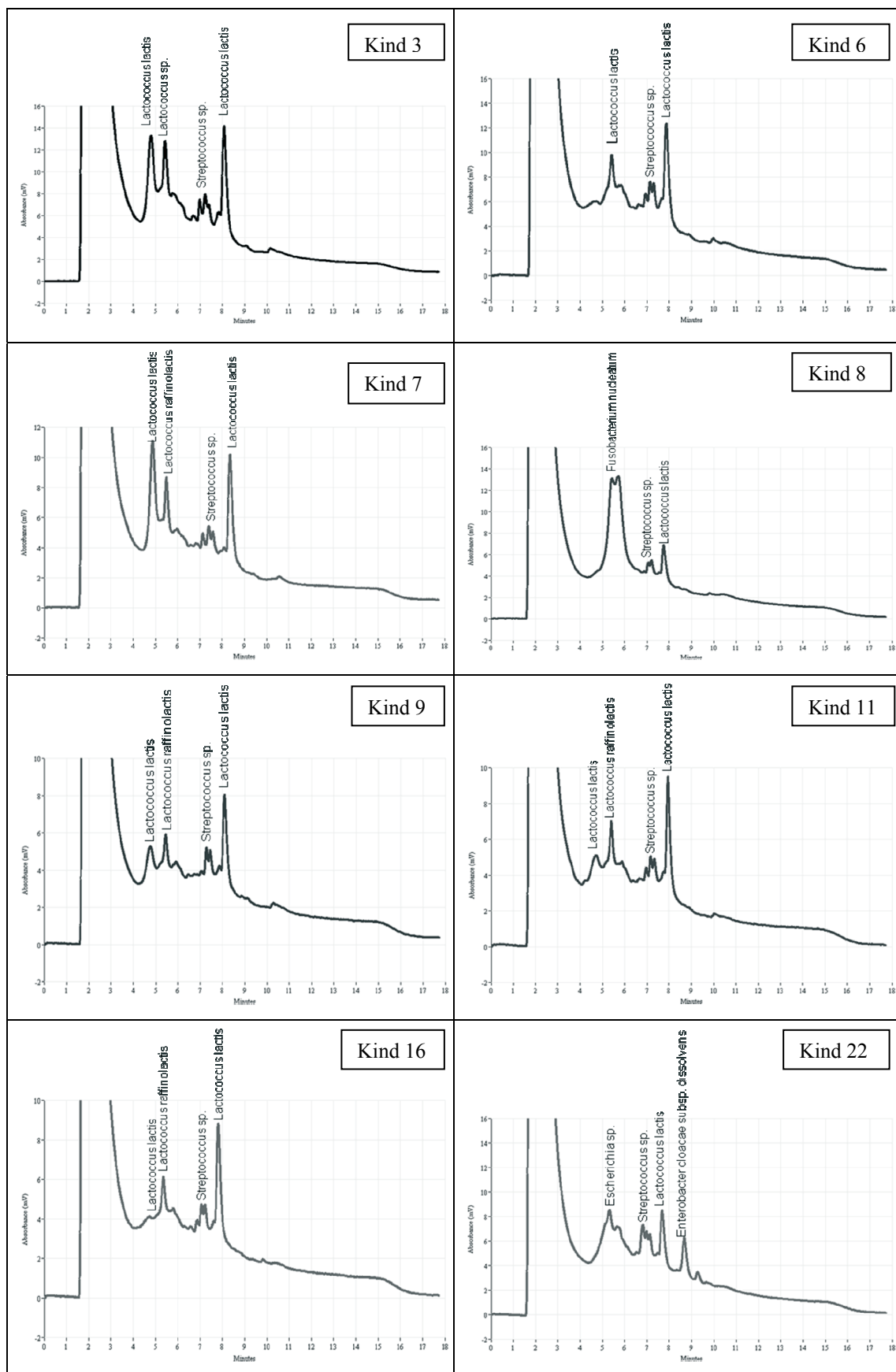




Abb. 4.5: Übersicht über die Sequenzierergebnisse der DHPLC-Peaks von Mekonium nach PCR mit dem piko<sup>®</sup> Thermal Cycler. Dargestellt sind die Peaks mit dem jeweiligen Sequenzierergebnis der Kinder Nr. 3, 6, 7, 8, 9, 11, 16 und 22.

War nach Ausstrich des Mekoniums Bakterienwachstum auf Schaedleragar vorhanden – wie bei vier Proben der Fall – wurde direkt aus den Bakterienkulturen eine DNA-Extraktion mit KOH-Lyse, anschließender PCR mit c-Primerpaar und eine Untersuchung mit DHPLC durchgeführt. Die DNA aus drei der vier Proben wurde über einen DHPLC-Sammellauf aufgefangen, aufgetrennt und bestimmt. Dabei ergaben sich für Kind 7 und 16 jeweils *Propionibacterium acnes* und für Kind 11 *Bacillus licheniformis*. Die Ergebnisse aus dem Sammellauf stimmten bei Kind 7 und Kind 11 mit denen aus der kulturellen Anzucht überein.

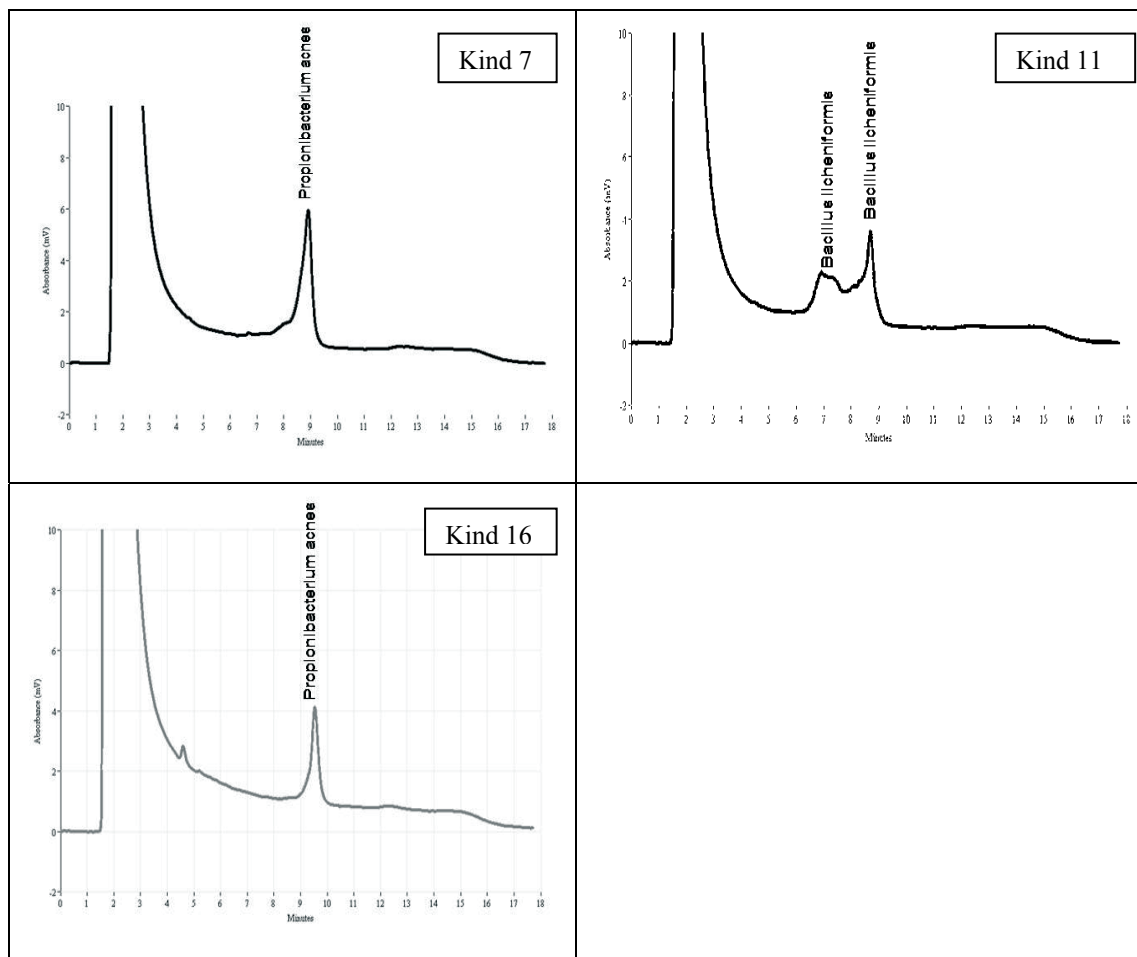


Abb. 4.6: Übersicht über die Sequenzierergebnisse der DHPLC-Peaks der Bakterienkulturen von Schaedleragar. Dargestellt sind die Peaks mit dem jeweiligen Sequenzierergebnis der Kinder Nr. 7, 11 und 16.

Insgesamt ergaben sich für den Nachweis von Bakterien aus Mekonium folgende Ergebnisse:

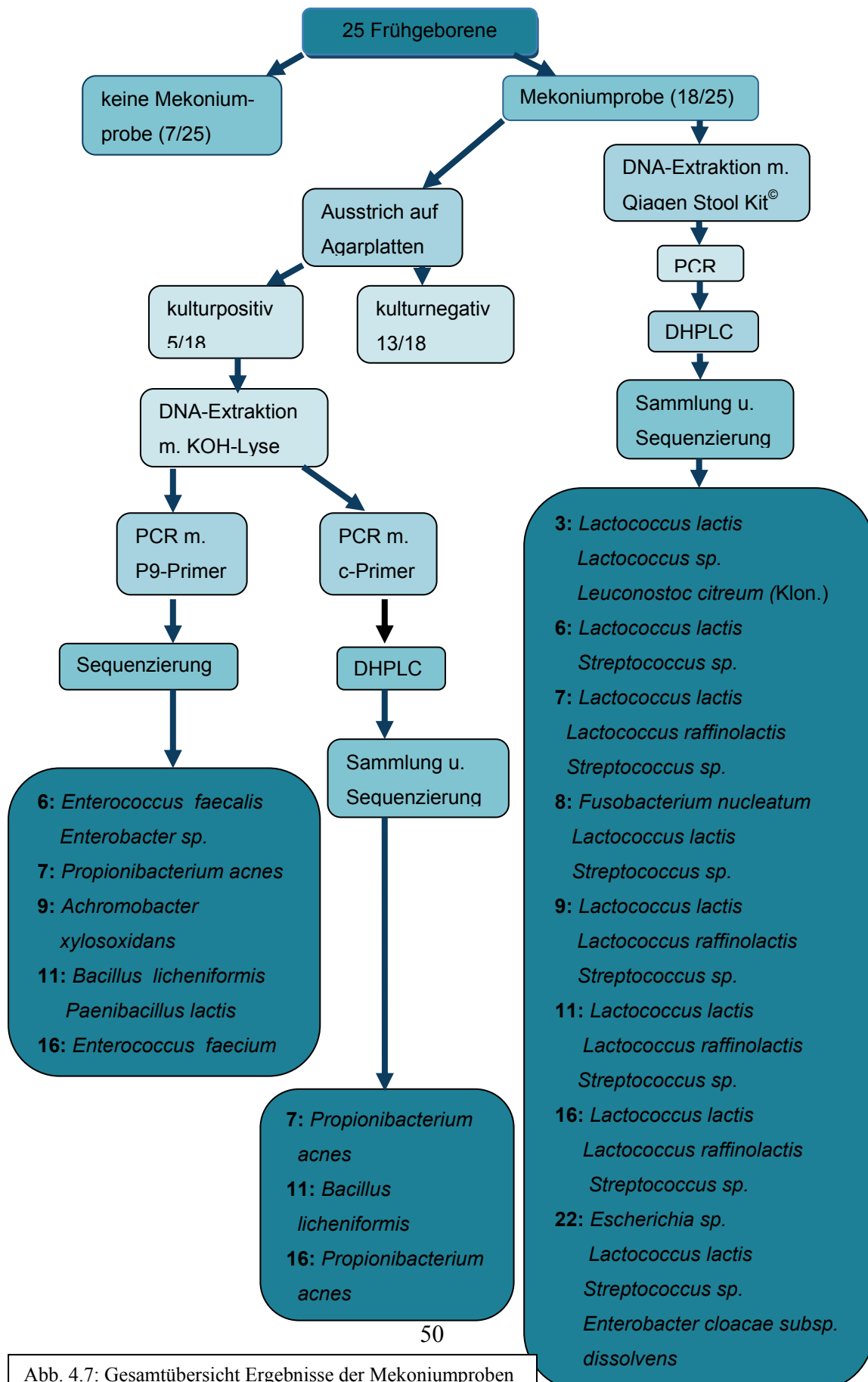


Abb. 4.7: Gesamtübersicht Ergebnisse der Mekoniumproben

### 4.3.3 Mikrobiom aus Mekonium der Frühgeborenen

Tabelle 4.4: Übersicht über das Mikrobiom der Frühgeborenen aus Untersuchungen von Mekonium

Kind	nachgewiesene Bakterien
3	<i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>
6	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>
7	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>
8	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>
9	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>
11	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Paenibacillus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>
16	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>
22	<i>Escherichia sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterobacter cloacae subsp. dissolvens</i>

## 4.4 Untersuchung von Stuhl

Wöchentlich wurde pro Kind mindestens ein Stuhl bis zu dessen Entlassung untersucht. Die meisten Stuhlproben lagen für die Woche zwei bis sechs nach Geburt vor, jeweils über zehn Proben pro Woche. Insgesamt wurden 112 Stuhlproben gesammelt, im Durchschnitt  $4,5 \pm 2,8$  pro Kind. Keines der 25 Kinder erhielt die Diagnose einer nekrotisierenden Enterocolitis.

Von allen Stuhlproben wurden eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese und eine DHPLC durchgeführt, ebenso von Subkulturen der 99 Schaedlerplatten.

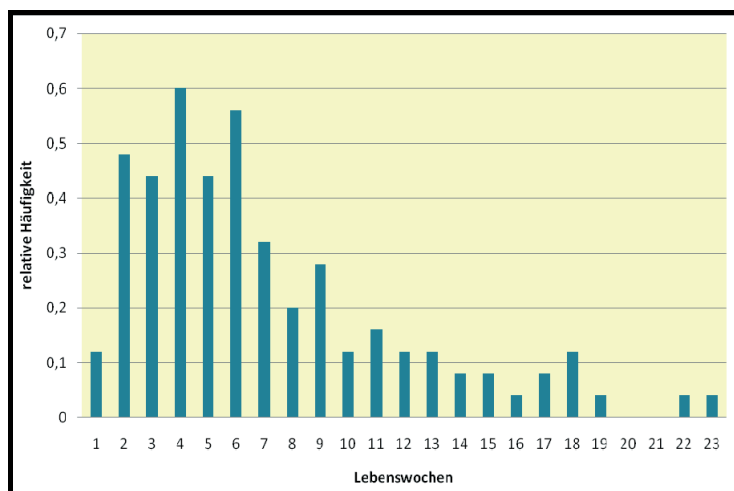


Abb. 4.8: Relative Anzahl der vorliegenden Stuhlproben pro Lebenswoche ab der Geburt, jeweils bezogen auf 25 Kinder, unter Ausschluß von Mekonium

### 4.4.1 Analyse des Bakterienwachstums auf den Kontrollplatten

Insgesamt waren bei 101 von 112 Stuhlproben Bakterien kulturell anzüchtbar. Die Identifikation der Bakterien auf den Agarplatten erfolgte rein qualitativ. Bei der Auswertung der Kontrollplatten zeigte sich, dass in der ersten Woche bei einem Drittel der Kinder noch kein Bakterienwachstum auf den Agarplatten vorlag. Ab der dritten Woche konnten bei allen Kindern bis auf eine Ausnahme Bakterien gefunden werden, ab der sechsten Lebenswoche waren alle Agarplatten bewachsen. Bei Kind Nr. 15 konnte erst ab der sechsten Woche Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Für die Auswertung

der Keimbesiedelung wurden in Tabelle 4.5 die ersten zehn Lebenswochen herangezogen, da für diese Zeit die meisten Proben vorlagen.

Tabelle 4.5: Relative Häufigkeit der angezüchteten Bakterien im Stuhl. Die Häufigkeit ist bezogen auf die Anzahl der in der jeweiligen Woche vorliegenden Stühle (=n), Darstellung der ersten zehn Lebenswochen, Angaben in Prozent.

Woche postnatal	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Anzahl Stühle (n)	3	11	11	15	11	14	8	5	7	3
kein Wachstum	33	36	9	7	9	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	25	27	53	55	50	25	20	57	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	8	18	20	9	21	38	0	29	33
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	18	18	13	9	0	0	20	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anaerobier unspez.</i> (Schäedler-Agar)	67	55	82	87	91	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	8	0	7	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	18	27	27	36	13	40	29	67
<i>Escherichia coli</i>	0	0	18	13	27	57	63	40	57	33
<i>Kebsiella. oxytoca</i>	33	8	0	0	0	14	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	8	0	7	9	14	13	0	14	0
<i>Klebsiella planticola</i>	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter sp.</i>	0	8	9	20	9	21	0	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0	0	9	7	9	0	13	0	0	0

Anaerobier waren ab der ersten Woche bei über der Hälfte der Kinder vorhanden. Ab der sechsten Woche nach Geburt war bei allen Kindern auf den Schäedlerplatten ein Wachstum zu verzeichnen.

*Enterococcus sp.* ließ sich ab der zweiten Woche nach Geburt nachweisen, dabei war *Enterococcus faecalis* insgesamt sehr viel häufiger vertreten als *Enterococcus faecium*. In den ersten Lebenswochen war häufiger *Enterococcus faecalis* vertreten, ab der 15. Lebenswoche trat *Enterococcus faecium* öfter auf. Insgesamt wuchs *Enterococcus sp.* bei 54% der untersuchten Stuhlproben.

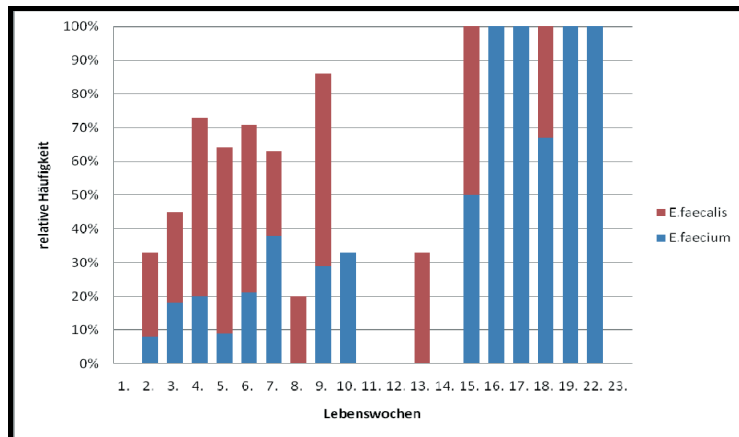


Abb. 4.9: Relative Häufigkeit der angezüchteten Enterokokken. Dargestellt ist die relative Häufigkeit von *Enterococcus sp.* bezogen auf die jeweils vorliegende Anzahl der Stuhlproben pro Lebenswoche. Die x-Achse zeigt die Lebenswochen an, die y-Achse die relative Häufigkeit in %.

*Staphylococcus sp.* trat vor allem von der zweiten bis zur fünften Lebenswoche auf, außerdem bei einem von fünf Kindern in der achten Woche, insgesamt bei 9% der untersuchten Stuhlproben. Bei zwei Kindern kam es zu einem Wachstum von *Staphylococcus sp.* in mehreren Stuhlproben im Verlauf, in den übrigen Fällen trat diese Bakteriengattung vereinzelt auf. Am häufigsten ließen sich dabei koagulasenegative Staphylokokken nachweisen. Ab der achten Lebenswoche traten sie nicht mehr in Erscheinung.

*Bacillus* wuchs insgesamt einmal in der Stuhlmikrobiota (Kind 19) und wurde als *Bacillus licheniformis* identifiziert.

Unter den *Enterobacteriaceae* war *E. coli* am häufigsten zu finden (35% aller Stuhlproben), gefolgt von *Enterobacter cloacae* in 26% der Proben und *Enterobacter aerogenes* in 9%. *E. coli* trat ab der dritten Lebenswoche erstmals auf, *Enterobacter sp.* war ab der zweiten Lebenswoche zu finden. *Enterobacter cloacae* dominierte vor allem in den frühen Stuhlproben, während zu einem späteren Zeitpunkt – ab der 16. Woche – häufiger *Enterobacter aerogenes* gefunden wurde.

*Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* waren gleich häufig vertreten (jeweils 9% aller Proben), wobei *Klebsiella pneumoniae* eher in den ersten Lebenswochen, *Klebsiella oxytoca* eher später zu finden war. Einmalig wurde *Klebsiella planticola* (Kind Nr. 6) identifiziert. Bei drei Kindern (Kinder Nr. 5, 9 und 17) kam es zu einem

gehäuftes Auftreten von *Klebsiella sp.* über mehrere Stuhlproben, sonst lagen diese sporadisch vor.

*Citrobacter freundii* ließ sich von der zweiten bis zur sechsten Woche nachweisen, in darauffolgenden Proben nicht mehr.

Ebenso wie *Pantoea agglomerans* zeigte sich *Kluyvera cryocrescens* sporadisch, in der dritten bis fünften sowie in der siebten und 13. Woche nach Geburt in jeweils einem Stuhl bei unterschiedlichen Kindern.

Insgesamt war die Vielfalt an *Enterobacteriaceae* in den ersten sechs Lebenswochen größer als in späteren Lebenswochen, zu diesem Zeitpunkt dominierten *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* und *Klebsiella oxytoca*.

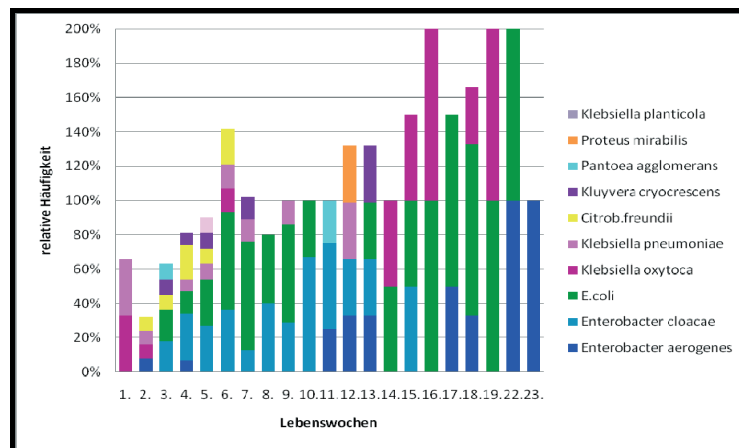


Abb. 4.10: Relative Häufigkeit der verschiedenen *Enterobacteriaceae*. Gezeigt werden die verschiedenen Bakteriengattungen und –spezies der Familie *Enterobacteriaceae*, bezogen auf die Anzahl vorliegender Stuhlproben in der jeweiligen Lebenswoche. Die x-Achse zeigt die Lebenswochen, die y-Achse die relative Häufigkeit an.

Über einen Verlauf von fünf Lebenswochen konnte zunächst ein Anstieg der verschiedenen Bakterienspezies beobachtet werden. Danach sank die Anzahl allmählich, gleichzeitig lagen weniger Proben vor (s. Abbildung 4.11).

Während sich für die Bakterienspezies ab der fünften Lebenswoche ein Abwärtstrend zeigte, erhöhte sich die tendenzielle Anzahl der vorliegenden Bakterienspezies pro Kind über die Lebenswochen bis zu einem tendenziellen Plateau ab der siebten Lebenswoche. Dies korrelierte mit der Abnahme von kulturnegativen Proben (s. Abbildung 4.12).

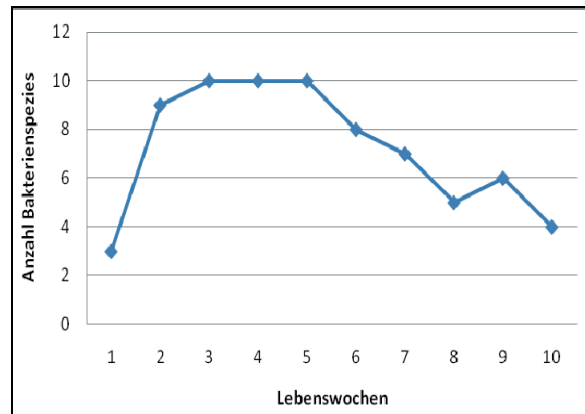


Abb. 4.11: Anzahl der gesamten gewachsenen Bakterienspezies pro Lebenswoche. In der Darstellung ist zu sehen, wie die Anzahl der gesamten angezüchteten Bakterienspezies zunächst bis zur dritten Lebenswoche ansteigt, dann ein Plateau erreicht, und nach der fünften Lebenswoche wieder abfällt. Auf der x-Achse befinden sich die Lebenswochen, auf der y-Achse die Anzahl der Bakterienspezies.

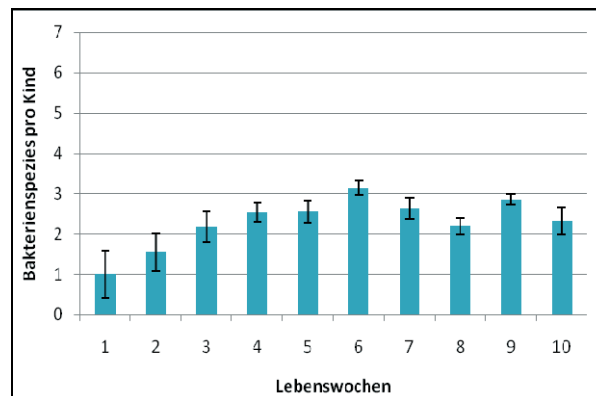


Abb. 4.12: Anzahl der Bakterienspezies pro Kind. Dargestellt ist die Gesamtzahl der angezüchteten Bakterienspezies pro Kind, bezogen auf die Lebenswochen, inklusive Standardfehler. Zu sehen ist ein tendenzieller Anstieg der Bakterienspezies bis zur sechsten Lebenswoche, gefolgt von einem tendenziellen Niveau bis zur zehnten Woche. Auf der x-Achse befinden sich die Lebenswochen, auf der y-Achse die Bakterienspezies pro Kind.

## 4.4.2 Analyse von Stuhl mit PCR und DHPLC

### 4.4.2.1 Korrelation zwischen Bakterienwachstum und Auftreten eines Peaks in der

#### *DHPLC*

Es lagen insgesamt 112 DHPLC-Untersuchungen aus Stuhlproben vor, alle Proben wurden mit PCR amplifiziert. In 78,6% der Fälle trat ein Peak auf, was in 77,7% aller Proben mit einem Bakterienwachstum auf den entsprechenden Kontrollplatten



korrelierte. Bei 12,5% der Proben zeigte sich trotz Bakterienwachstum kein Peak in der DHPLC. Dies trat gehäuft in den ersten fünf Lebenswochen auf. Außerhalb dieses Zeitraums waren eine DHPLC ohne Generierung eines Peaks nur noch in der neunten und der 17. Lebenswoche vorhanden. In 8,9% der Fälle kam es weder zu einem Bakterienwachstum noch zu einem Peak in der DHPLC. Insgesamt stimmte in 86,6% der Proben das Vorhandensein bzw. Fehlen von Bakterienwachstum mit dem Auftreten bzw. Fehlen eines Peaks überein.

Tabelle 4.6: Relative Übereinstimmung von Bakterienwachstum auf Agarplatten und Auftreten eines Peaks in der DHPLC

	Peak in der DHPLC			$\Sigma$
		ja	nein	
Bakterienwachstum auf Agarplatten	ja	77,7%	12,5%	90,2%
	nein	0,9%	8,9%	9,8%
$\Sigma$		78,6%	21,4%	100%

#### 4.4.2.2 Analyse der Peaks

Entsprechend der hohen Variabilität der individuellen Darmmikrobiota gestaltete sich der Verlauf der Peaks in der DHPLC intra- und interindividuell sehr unterschiedlich. Vereinzelt auftretender Abfall der Amplitude von einer Lebenswoche zur anderen bei einzelnen Kindern ließ sich nicht in Zusammenhang mit klinischen Daten setzen, wie z.B. Verabreichung von Antibiotika oder Nahrungsumstellung.

Insgesamt ergab sich eine Tendenz zur Zunahme der Peaks mit zunehmender Anzahl der Lebenswochen. Da ab der zwölften Lebenswoche die Anzahl der Proben deutlich sank, wurden diese nicht mit in Abbildung 4.13 mit aufgenommen.

Setzt man die Anzahl der Peaks in der DHPLC und die Anzahl der angezüchteten Bakterienspezies nebeneinander, ergibt sich bei beiden parallel eine tendenzielle Zunahme über die Zeit (s. Abb. 4.14). Dabei fällt auf, dass sich ab der fünften Woche nach Geburt die Anzahl der Peaks der Anzahl der angezüchteten Bakterienspezies angleicht bzw. diese übersteigt.

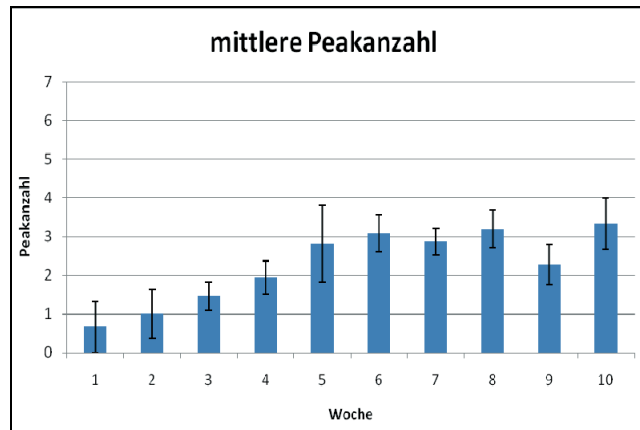


Abb. 4.13: Mittlere Peakanzahl im Stuhl pro Lebenswoche. Gezeigt sind die Werte mit Standardfehler, man sieht eine tendenzielle Zunahme bis zur zehnten Lebenswoche, mit zwischenzeitlichem Abfall in der siebten und der neunten Lebenswoche. Die x-Achse zeigt die Lebenswoche, die y-Achse die Peakanzahl.

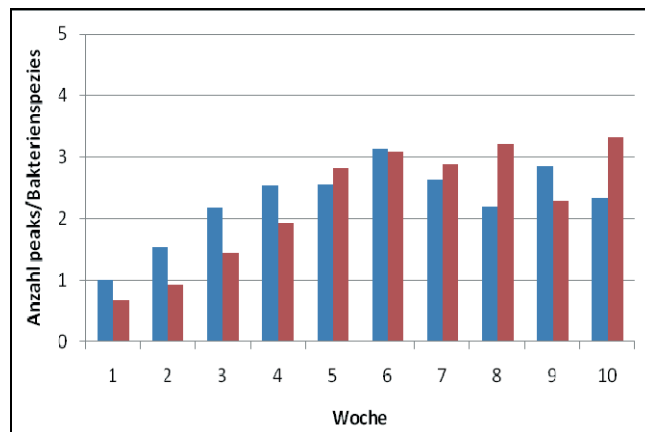


Abb. 4.14: Gegenüberstellung der Anzahl der Peaks und der angezüchteten Bakterienspezies. Dargestellt sind die Werte in blau= Kulturergebnis und rot= Peak-Anzahl. Auf der x-Achse befindet sich die Lebenswoche, auf der y-Achse die Anzahl der Peaks bzw. Bakterienspezies. Insgesamt handelt es sich um eine Zusammenführung der Ergebnisse aus Abb. 4.12 und 4.13.

Zur Beurteilung der Amplitude, die für die DNA-Konzentration steht, wurde gemäß der Skalierung der y-Achse eine Einteilung in 2mV-Schritten vorgenommen, d.h. die Auszählung der Amplitude wurde in Gruppen eingeteilt mit 0mV, 0-2mV, 2-4mV usw. Höhere Amplituden im Bereich 6-8mV bzw. 8-10mV traten erst in späteren Lebenswochen auf, ab der vierten bzw. ab der sechsten Lebenswoche. Am häufigsten fanden sich Peaks mit einer Amplitude zwischen 2mV und 4mV.

Zusätzlich wurde die Peakmorphologie zwischen den Mehrlingen verglichen. Dafür wurden Proben der Zwillingspaare/Drillinge mit übereinstimmendem Entnahmezeitpunkt  $\pm 2$  Tage mit der Frage nach Übereinstimmung im Aufbau der Kurven bzw. identischen Retentionszeiten verglichen. Von den fünf Mehrlingspaaren/Drillingen lagen bei vier Paaren (Kinder 4+5, Kinder 9+10, Kinder 11+12+13, Kinder 21+22, insgesamt neun Kinder) insgesamt 16 identische Entnahmezeitpunkte vor, für die die Peakmorphologien beurteilt werden konnten. Für zwei Entnahmezeitpunkte zeigten zwei Zwillingspaare jeweils übereinstimmend keinen Peak (Kind Nr. 9, Probe 3 und Kind Nr. 10, Probe 2; Kind Nr. 21, Probe 2 und Kind Nr. 22, Probe 2).

Sich ähnelnde Peakmorphologien traten bei zwei weiteren Entnahmezeitpunkten auf: Bei Kind Nr. 9 und Nr. 10 in der fünften Lebenswoche, bei Kind Nr. 12 und Nr. 13 in der vierten Lebenswoche, so dass es insgesamt bei einem Viertel aller Proben von Mehrlingen mit identischem Entnahmezeitpunkt zu übereinstimmenden Peakmorphologien kam.

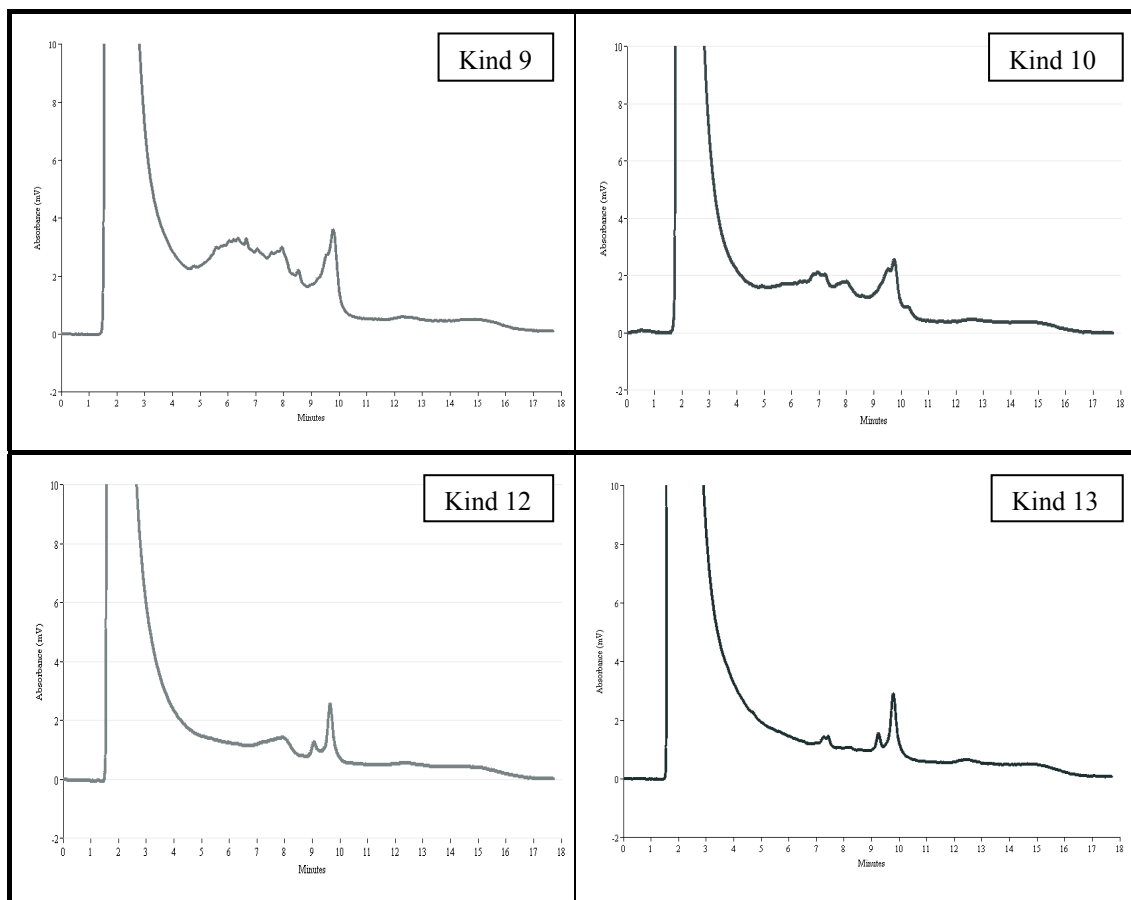


Abb. 4.15: Darstellung ähnlicher Peakmorphologien. Dargestellt sind Chromatogramme aus Stuhlproben von Mehrlingen, die bei identischen Entnahmezeitpunkten Ähnlichkeiten im Verlauf zeigen. Bei

Zwillingspaar 9+10 stammen die Proben aus der fünften Lebenswoche, bei dem Paar 12+13 aus der vierten Lebenswoche.

## 4.4.2.3 Ergebnisse der Auftrennung einzelner Peaks per DHPLC

Exemplarisch wurden bei acht Stuhlproben mithilfe der DHPLC einzelne Peaks aufgetrennt und die einzelnen Vials sequenziert, um Mischkulturen zu identifizieren. Die Kriterien für die ausgewählten Proben waren mehrere und deutlich voneinander abgrenzbare Peaks, da hier am wahrscheinlichsten eine polymikrobielle Mikrobiota vermutet wurde. Bei der Auswertung der Sequenzierungen wurden ausschließlich Ergebnisse mit einer Datenbank-Übereinstimmung von >96% berücksichtigt. Im Folgenden sind exemplarisch vier Chromatogramme dargestellt.

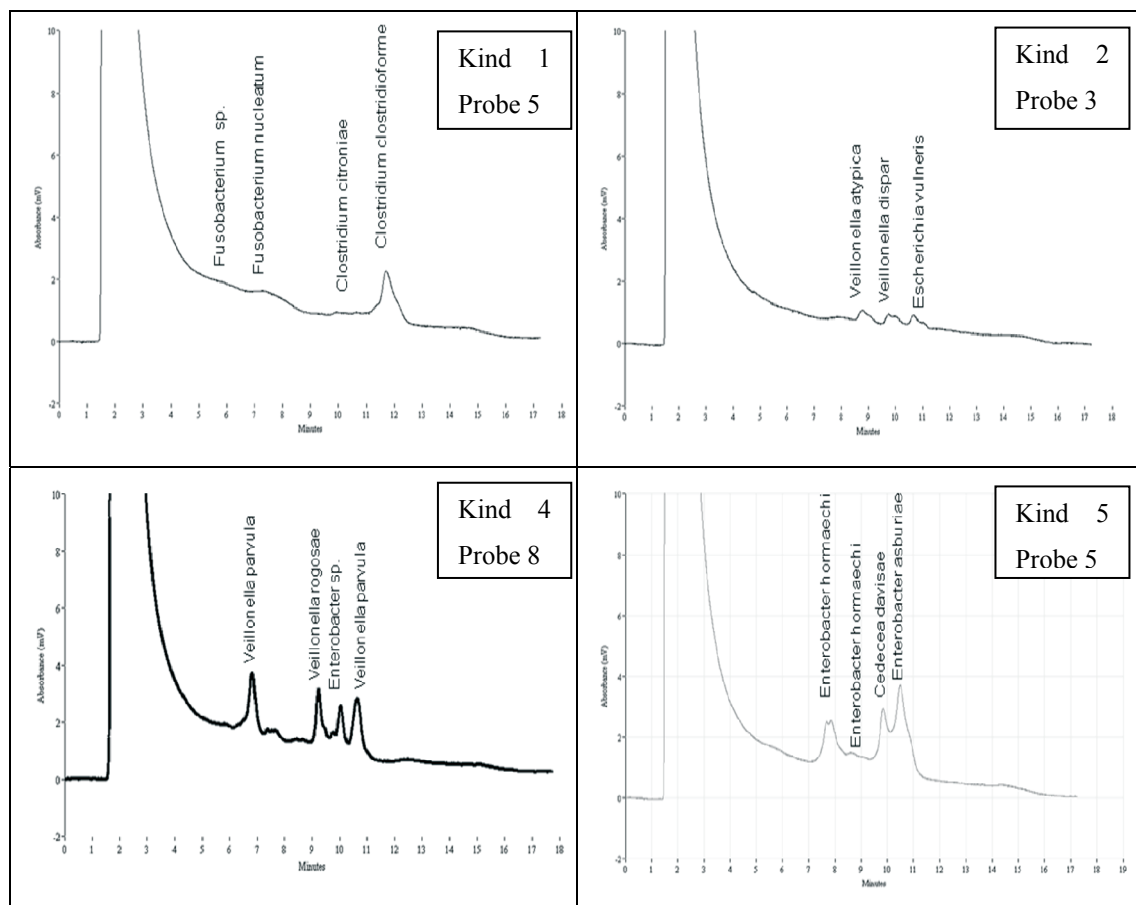


Abb. 4.16: Übersicht über die Sequenzierungsergebnisse der DHPLC-Peaks von Stuhlproben. Dargestellt sind die Peaks mit dem jeweiligen Sequenzierungsergebnis der Kinder Nr. 1, Nr. 2, Nr. 4, und Nr. 5.

Tabelle 4.7 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der kulturellen Anzucht und der DHPLC-Analyse der acht näher untersuchten Proben. Mit der DHPLC wurden ausschließlich anaerobe Bakterien nachgewiesen, in den meisten Fällen *Enterobacteriaceae* sowie *Clostridium sp.*, *Veillonella sp.* und *Fusobacterium sp.*, wovon bis auf *Clostridium* alle gramnegativ sind.

Tabelle 4.7: Gegenüberstellung des Bakterienwachstums auf den Agarplatten und der Analyse der Stuhlproben mit DHPLC

Probe	Agarplatte	DHPLC
Kind 1 Probe 1	kein Wachstum	<i>Enterobacter hormaechi</i>
Kind 1 Probe 2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>E. coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> Schaedler bewachsen	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Citrobacter gillenii</i> <i>Citrobacter sp.</i>
Kind 1 Probe 5	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>E. coli</i> Schaedler bewachsen	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium sp.</i> <i>Clostridium citroniae</i> <i>Clostridium clostridioforme</i>
Kind 2 Probe 3	<i>Enterobacter cloacae</i> Schaedler bewachsen	<i>Veillonella atypica</i> <i>Veillonella dispar</i> <i>Escherichia vulneris</i>
Kind 4 Probe 4	<i>Enterobacter cloacae</i> Schaedler bewachsen	<i>Cedecea davisae</i> <i>Cedecea sp.</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter sp.</i>
Kind 4 Probe 8	<i>E. coli</i> Schaedler bewachsen	<i>Veillonella parvula</i> <i>Veillonella rogosae</i> <i>Enterobacter sp.</i>
Kind 5 Probe 5	<i>Enterobacter cloacae</i> Schaedler bewachsen	<i>Enterobacter hormaechi</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Cedecea davisae</i>
Kind 8 Probe 5	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>E. coli</i> Schaedler bewachsen	<i>Escherichia sp.</i>

#### 4.4.4 Analyse aus Bakterienkulturen von Schaedleragar

Von den 99, in fast allen Fällen dicht bewachsenen Schaedlerplatten wurden Mischkulturen durch Entnahme von morphologisch verschiedenen Bakterienkulturen abgenommen und deren DNA durch KOH-Lyse extrahiert. Die PCR mit c-Mastermix produzierte deutliche Banden in der Gelelektrophorese, die Amplifikate wurden daraufhin mit der DHPLC analysiert. Morphologisch zeigten die Peaks von Schaedleragar-Kulturen ein breites Spektrum.

Exemplarisch wurden die Peaks von drei Amplifikaten aus Bakterienkolonien von Schaedleragar mithilfe der DHPLC fraktioniert gesammelt, amplifiziert und sequenziert. Die Peaks konnten *Enterobacter hormaechi*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter sp.* und *Pantoea agglomerans* zugeordnet werden.

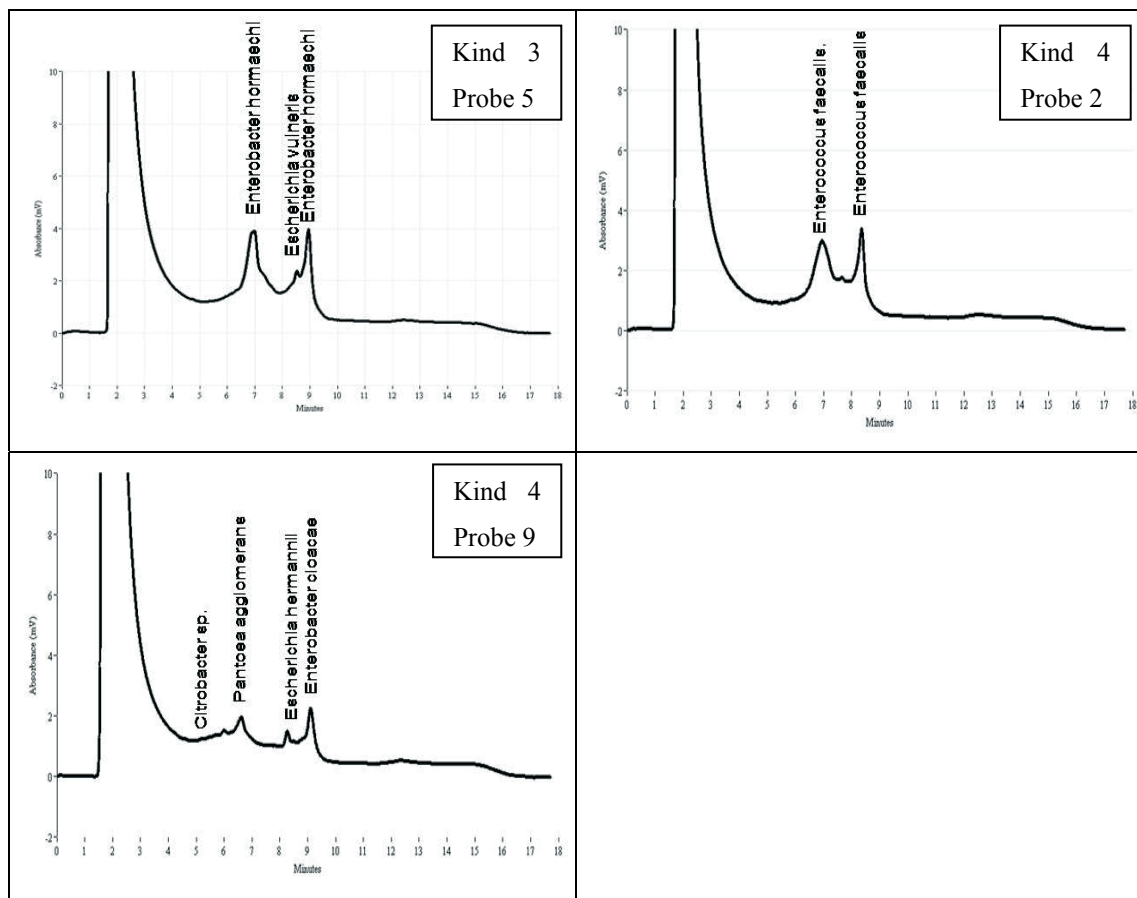


Abb. 4.17: Übersicht über die Sequenzierungsergebnisse der DHPLC-Peaks von Bakterienkulturen von Schaedleragar. Dargestellt sind die Peaks mit dem jeweiligen Sequenzierungsergebnis der Kinder Nr. 3 und Nr. 4.

Insgesamt ergibt sich für die Auswertung der sowohl kulturell als auch molekularbiologisch untersuchten Proben folgendes Mikrobiom:

Tabelle 4.8: Mikrobiom aus den Stuhlproben der Frühgeborenen im Verlauf. Dargestellt sind Proben, bei denen kulturelle Anzucht und molekularbiologische Untersuchung aus Stuhl erfolgte. Abkürzungen: K/P = Kind/Probe, W = Woche.

K/P	W	nachgewiesene Bakterien	K/P	W	nachgewiesene Bakterien
1/1	11	<i>Enterobacter hormaechi</i>	4/4	10	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Cedecea davisae</i> <i>Cedecea sp.</i>
1/2	17	<i>Enterococcus faecium</i> <i>E. coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Citrobacter gillenii</i> <i>Citrobacter sp.</i>	4/8	14	<i>E.coli</i> <i>Veillonella parvula</i> <i>Veillonella rogosae</i> <i>Enterobacter sp.</i>
1/5	23	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>E.coli</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium sp.</i> <i>Clostridium citroniae</i> <i>Clostridium clostridioforme</i>	4/9	15	<i>E.coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Citrobacter sp.</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Escherichia hermannii</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
2/3	8	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Veillonella atypica</i> <i>Veillonella dispar</i> <i>Escherichia vulneris</i>	5/5	12	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechi</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Cedecea davisae</i>
3/5	8	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechi</i> <i>Escherichia vulneris</i>	8/5	6	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>E.coli</i> <i>Escherichia sp.</i>
4/2	5	<i>Enterococcus faecalis</i>			

## 4.5 Zusammenhang zwischen Sepsis bzw. Ursachen der Frühgeburt und Ergebnissen aus Mekonium, Trachealsekret und Stuhl

### 4.5.1 Ergebnisse aus Mekonium und Trachealsekret und deren Zusammenhänge mit konnataler Sepsis und Frühgeburtlichkeit

Bei 15 von 25 Kindern lag eine konnatale Sepsis bzw. der Verdacht darauf vor (60%). Knapp zwei Drittel (64%) der Kinder mit einer konnatalen Sepsis hatten dabei ein Gestationsalter von unter 29 Schwangerschaftswochen. Bei 12 von 25 Kindern (48%) bestand der Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom. Bei 16 Kindern lag das Ergebnis der postpartal entnommenen Blutkultur vor, wovon zwei positiv waren. Hierbei handelte es sich um koagulasenegative Staphylokokken (Kind Nr. 19) und um *Lactobacillus viridescens* (Kind Nr. 20).

Insgesamt konnte aus den Akten das Ergebnis der Blutkultur von zwölf Kindern entnommen werden, bei denen gleichzeitig die Diagnose einer konnatalen Sepsis vorlag. Nur zwei dieser zwölf Blutkulturen waren positiv. Sechs Blutkulturen bei Kindern ohne konnatale Sepsis waren negativ. Dies entspricht in der vorliegenden Untersuchung für eine Sensitivität der Blutkultur von 16,7% und einer Spezifität von 100%, dabei sollte jedoch das kleine Patientenkollektiv beachtet werden.

Tab. 4.9: Vergleich konnatale Sepsis und Ergebnis der Blutkultur anhand der Aktenlage

		konnatale Sepsis		$\Sigma$
		positiv	negativ	
Blutkultur	positiv	2	0	2
	negativ	10	6	16
$\Sigma$		12	6	18

Von den beiden Kindern mit der positiven Blutkultur lag von Kind 19 Trachealsekret vor. Aus diesem ließen sich keine Bakterien anzüchten, auch die PCR und DHPLC



zeigten keinen Hinweis auf bakterielle DNA. Das Mekonium war kulturnegativ, in der DHPLC zeigten sich Peaks.

Von den vier Kindern mit Nachweis von Bakterien im Trachealsekret zeigten alle eine konnatale Sepsis, bei Kind 9 und 10 lag außerdem der Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom vor. Bei allen war das Ergebnis der Blutkultur negativ.

Von den fünf Kindern mit kulturpositivem Mekonium litt eines unter einer konnatalen Sepsis (Kind Nr. 9), bei drei Kindern lag ein Amnioninfektionssyndrom vor (Kinder Nr. 6, 9 und 11). Die Blutkulturen aller Kinder mit kulturpositivem Mekonium waren negativ. Alle 18 Mekoniumproben generierten unabhängig von einer vorliegenden Sepsis Peaks in der DHPLC. Insgesamt wurden von acht Mekoniumproben Sammelläufe mit der DHPLC durchgeführt, davon litten vier Kinder unter einer konnatalen Sepsis (Kinder Nr. 3, 8, 9, 22).

Insgesamt wurden vier Trachealsekrete und acht Mekoniumproben von insgesamt neun Kindern mit einem DHPLC-Sammellauf untersucht. Enthalten waren alle Proben, die kulturpositiv waren. Von den neun Kindern war allen bis auf einem (Kind Nr. 6) eine Blutkultur entnommen worden, die bei allen negativ war. Vier hatten eine konnatale Sepsis, fünf ein Amnioninfektionssyndrom, bei sechs Kindern war der Auslöser der Frühgeburt vorzeitige Wehentätigkeit, bei drei Kindern zusätzlich ein vorzeitiger Blasensprung.

Tabelle 4.10: Mikrobiom, Sepsis und Ursache der Frühgeburt. Dargestellt sind die im Mekonium und Trachealsekret nachgewiesenen Bakterien sowie klinische Angaben. Abkürzungen: AIS = Amnioninfektionssyndrom; vorz. WT = vorzeitige Wehentätigkeit; PROM = premature rupture of membranes.

Kind	Bakterium	konnatale Sepsis	AIS	vorz. WT, PROM
3	<i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	ja	ja	vorz. WT
6	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	nein	ja	vorz. WT, PROM
7	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	nein	nein	-
8	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	ja	nein	vorz. WT
9	<i>Bacillus cereus</i> <i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	ja	ja	vorz. WT, PROM
10	<i>Bacillus sp.</i>	ja	ja	vorz. WT, PROM
11	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Paenibacillus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	nein	ja	vorz. WT
16	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	nein	nein	-
22	<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i> <i>Enterobacter cloacae subsp. dissolvens</i> <i>Escherichia sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus sp.</i>	ja	nein	-

#### 4.5.2 Ergebnisse aus der Untersuchung von Stuhl und Zusammenhänge mit

##### späteinsetzender Sepsis

Insgesamt wurden die Ergebnisse von 16 Blutkulturen für die Untersuchungen zur späteinsetzenden Sepsis einbezogen, wovon sechs (37,5%) positiv waren. Es wurden dabei nur Blutkulturen berücksichtigt, die frühestens ab dem vierten Tag nach Geburt entnommen wurden.

Von den positiven Blutkulturen zeigten fünf koagulasenegative Staphylokokken (Kinder Nr. 1, 4, 20, 21 und 23). Bei Kind 21 wurde zusätzlich *Bacillus cereus* in der Blutkultur nachgewiesen, bei Kind 17 *Enterococcus faecalis*.

Von den fünf Kindern mit koagulasenegativen Staphylokokken in der Blutkultur wies nur Kind Nr. 23 diese Bakterien auch im Darm auf, sechs Tage nach Entnahme der Blutkultur.

Bei insgesamt fünf Kindern ließen sich koagulasenegative Staphylokokken im Stuhl nachweisen (Kinder Nr. 7, 10, 13, 19, 23). Bei den Kindern Nr. 7, 10 und 13 trat im Verlauf keine Sepsis auf. Bei Kind Nr. 19 wurden direkt nach Geburt in der Blutkultur koagulasenegative Staphylokokken nachgewiesen, diese ließen sich in anschließenden Stuhlproben bis zur 8. Woche postnatal noch nachweisen.

Unter der Annahme, dass bei Entnahme einer Blutkultur ein klinischer Verdacht auf eine Sepsis besteht, wurden für die Untersuchung auf mögliche Zusammenhänge zwischen Stuhlmikrobiota und späteinsetzender Sepsis Stuhlproben berücksichtigt, die bis zu drei Tage vor bzw. nach Entnahmedatum einer der insgesamt 16 Blutkulturen entnommen wurden. Dabei wurden sowohl Ergebnisse aus der kulturellen Anzucht als auch der PCR/DHPLC aus Stuhlproben berücksichtigt. Für sieben Stuhlproben waren diese Kriterien erfüllt.

Bei diesen sieben Proben fiel auf, dass bei drei Kindern die Stuhlproben, die vor Entnahme der Blutkulturen entnommen wurden, kulturnegativ waren. Die Proben stammten jeweils aus der zweiten, dritten und vierten Woche nach Geburt. Bei zwei dieser Kinder (Nr. 15 und 24) waren bis zu diesem Zeitpunkt mehrere verschiedene Antibiotika (unter anderem Vancomycin und Imipenem) über mehrere Tage verabreicht worden, auch deren Blutkulturergebnisse waren negativ.

Bei allen vier kulturpositiven Kindern fanden sich Enterokokken in den Stuhlproben. Bei einem dieser Kinder (Nr. 17) war das in der Blutkultur nachgewiesene Bakterium – *Enterococcus faecalis* – zwei Tage nach, ebenso wie fünf Tage vor dessen Nachweis in der Blutkultur im Stuhl nachweisbar.

Untersucht wurden außerdem Änderungen im Verlauf von einer Stuhlprobe zur nächsten, die die Entnahme einer Blutkultur zeitlich einrahmten. Der zeitliche Abstand zwischen Stuhlprobe und Blutkultur wurde dabei auf maximal drei Tage vor und sechs Tage nach Entnahme der Blutkultur festgelegt. Im Rahmen dieser Kriterien konnten vier Proben beurteilt werden, bei denen sowohl die Ergebnisse aus der Kultur als auch die aus PCR/DHPLC einfließen. Dabei fiel auf, dass alle Stuhlproben in der DHPLC vor der Blutkultur deutlich mehr Peaks mit höherer Amplitude zeigten als die Proben nach der Blutkultur. In zwei Fällen waren gar keine Peaks mehr vorhanden. Bei drei Proben ließen sich nach der Blutkultur noch Bakterien anzüchten, die Anzahl der Spezies war jedoch geringer als vor Entnahme der Blutkultur, in allen drei Fällen war der Schaedleragar noch bewachsen.

Die Ergebnisse der PCR/DHPLC von Kind 20 sind beispielhaft in der Abbildung 4.18 dargestellt.

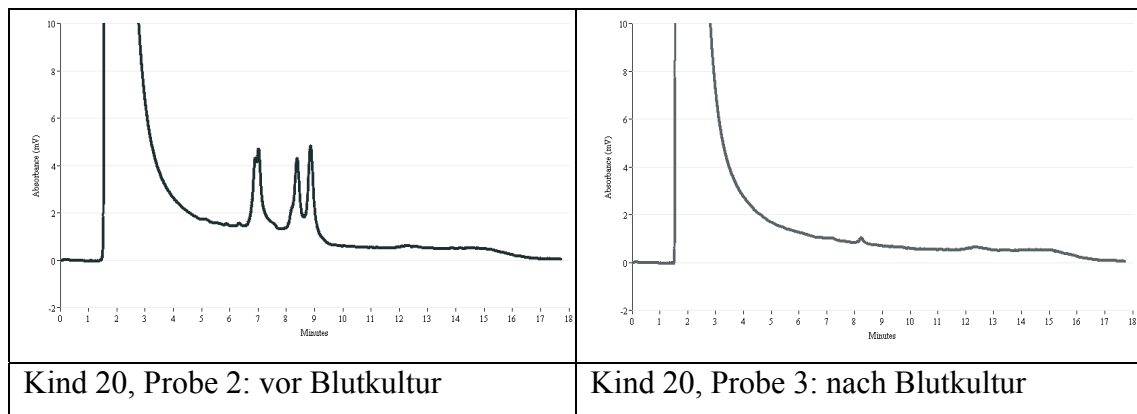


Abbildung 4.18: Darstellung der Veränderung der DHPLC-Kurve zwischen der Stuhlprobe jeweils vor und nach Entnahme der Blutkultur. Zu sehen ist die Auslöschung der Peaks im Rahmen der Verabreichung von Antibiotika.

## 5. Diskussion

Unter anderem durch die Fortschritte in der Reproduktionsmedizin ist die Anzahl der Frühgeburten – vor allem der extrem frühen - in den letzten Jahren deutlich angestiegen. Hierbei gelten Infektionen z.B. durch das Auslösen vorzeitiger Wehentätigkeit oder eines Blasensprungs als einer der Hauptgründe für Frühgeburtlichkeit<sup>(76, 82, 91)</sup>. Vertikal oder nosokomial erworbene Infektionen stellen darüber hinaus bei Frühgeborenen – besonders bei den sehr kleinen – durch das ungenügend entwickelte Immunsystem die Hauptursache für Morbidität und Mortalität dar. Während in den westlichen Industrieländern die Rate der an Sepsis erkrankten Lebendgeborenen nur 0,4% beträgt, liegt die Inzidenz auf neonatologischen Intensivstationen bei ca. 25%<sup>(51)</sup>. Erschwert wird die Sepsisdiagnostik durch das geringe Blutvolumen bei Frühgeborenen, und durch meist negative Blutkulturen trotz klinischer Zeichen einer Sepsis<sup>(59, 60)</sup>.

Um frühzeitig Infektionen zu erkennen und das vorliegende Bakterium genau zu identifizieren, bedarf es schneller, reproduzierbarer Methoden. Da sich viele der vorhandenen Bakterien nicht auf Nährmedien kultivieren lassen, ist das Zurückgreifen auf molekularbiologische, kultivierungsunabhängige Techniken von Vorteil<sup>(23, 24, 38)</sup>. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden – im Vergleich mit konventionellen Techniken – die leicht zugänglichen Materialien Mekonium und Trachealsekret Frühgeborener auf das Vorhandensein von bisher schwer kultivierbaren Bakterien zu untersuchen, um mögliche Erreger einer konnatalen Sepsis zu identifizieren. Darüber hinaus sollten die Proben auf mögliche auslösende Erreger der Frühgeburtlichkeit untersucht werden. Ferner wurde mit der DHPLC in regelmäßigen Abständen die Stuhlmikrobiota analysiert, um mit der Anwendung neuer Methoden Erkenntnisse über mögliche Ursachen für eine späteinsetzende Sepsis bei Frühgeborenen mit dem Darm als Erregerreservoir beizutragen und die bisherigen Erkenntnisse über die Entwicklung der Darmmikrobiota bei Frühgeborenen zu erweitern.

Im Folgenden werden zunächst die in Mekonium und Trachealsekret nachgewiesenen Bakterien und deren bisher bekannter Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit und früh-einsetzender Sepsis näher erläutert. Insgesamt wurden im Trachealsekret und Mekonium mit der Kombination von kultureller Anzucht und PCR/DHPLC folgende

Keime nachgewiesen: *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus lactis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Leuconostoc citreum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus*, *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens*, *Enterobacter sp.* und *Escherichia sp.*

Bei der Gattung *Bacillus sp.* handelt es sich um aerobe, grampositive, sporenbildende Bakterien, von denen bis auf wenige Ausnahmen alle Spezies für den Menschen fakultativ pathogen oder apathogen sind <sup>(43)</sup>. *Bacillus cereus* und *Bacillus licheniformis* kommen ubiquitär in der Umwelt vor <sup>(67)</sup>, *Bacillus licheniformis* vor allem im Boden <sup>(1, 2, 3)</sup>. Die Sporen sind resistent gegenüber Hitze, Strahlung, Desinfektionsmitteln und Austrocknung, aus diesem Grund ist insbesondere *Bacillus cereus* als opportunistisch pathogener Keim in Kliniken beschrieben <sup>(67)</sup>.

*Bacillus cereus* kann über kontaminierte Nahrungsmittel eine Lebensmittelvergiftung hervorrufen, ferner wurden bei immunsuprimierten Patienten neben Infektionen im Bereich des Gehirns, des Skelettsystems und des Urogenitaltraktes auch Fälle von Bakteriämie und Sepsis durch *Bacillus cereus* beschrieben. *Bacillus cereus* als Auslöser einer Sepsis bei Frühgeborenen wurde im Rahmen einer Frühform von John et al. beschrieben, im Rahmen einer Spätform von Hilliard et al. <sup>(42, 49)</sup>. Bei Neugeborenen scheint eine gewisse Empfänglichkeit für *Bacillus cereus* zu bestehen, so findet sich der Keim bei Nabel- und Atemwegsinfektionen, letztere verursacht durch kontaminierte Beatmungssysteme <sup>(67, 100)</sup>. Van der Zwet et al. beschrieben aber auch mögliche Pseudo-Epidemien und Kontaminationen von Proben, so dass in der vorliegenden positiven Probe eine Kontamination nicht auszuschließen ist. Bei diesem Ergebnis scheint beachtenswert, dass das betroffene Kind das einzige der untersuchten 25 Frühgeborenen war, dass ein Atemnotsyndrom IV° aufwies. Gegen eine Kontamination spricht auch die Tatsache, dass es sich bei dem Kind, in dessen Trachealsekret *Bacillus sp.* nachgewiesen wurde, um den Zwillingsbruder handelt. Obwohl eine Identifizierung dieses Bakteriums nicht bis zur Spezies möglich war, scheint es wahrscheinlich, dass es sich hierbei ebenfalls um *Bacillus cereus* handelt.

Bei Kind Nr. 11 wurden *Bacillus licheniformis* und *Paenibacillus lactis* nachgewiesen. Beim Menschen wurde *Bacillus licheniformis* neben verschiedenen anderen

Lokalisationen auch als Verursacher einer Sepsis beschrieben, wobei die Infektionen jeweils als Folge eines operativen Eingriffs oder einer Verletzung entstanden <sup>(67)</sup>. Lépine et al. beschrieben *Bacillus licheniformis* als auslösendes Bakterium einer Spätform der Sepsis bei einem neun Tage alten Frühgeborenen, vermutlich verursacht von einem zentralen Venenkatheter <sup>(54)</sup>. Mehrfach wurden Studien über *Bacillus licheniformis* als Verursacher von Aborten bei Kühen beschrieben <sup>(1, 2, 3, 62, 79)</sup>. Besonders Agerholm et al. führten hierzu mehrere Studien zwischen 1995 und 1999 durch. In diesen zeigte sich, dass es bei einer Infektion von tragenden Rindern mit *Bacillus licheniformis* zu einer nekrotisierenden Plazentitis kommt. Vereinzelt fand sich eine Streuung ins Fruchtwasser, was bei den Feten zu Pneumonie und Enteritis führte. Die Ausbreitung der Infektion mit dem plazentotropen Keim spricht für eine hämatogene mit transplazentarer Übertragung, wahrscheinlich im Rahmen kleiner plazentärer Hämorrhagien, die häufiger in der Spätschwangerschaft vorkommen <sup>(1, 2, 3)</sup>. *Bacillus sp.* wurde von DiGulio et al. im Fruchtwasser bei Frühgeburten gefunden <sup>(23)</sup>. Bei Kind Nr. 11 handelt es sich um einen dreieiigen Drilling, im Mekonium des einen Geschwisters (Kind Nr. 12) ließ sich das Bakterium nicht nachweisen, vom anderen Geschwister (Kind Nr. 13) lag kein Mekonium vor. Die Frühgeburtslichkeit erfolgte aufgrund vorzeitiger Wehentätigkeit. Ein Amnioninfektionssyndrom wurde nur bei Kind Nr. 11 vermutet, eine konnatale Sepsis lag bei keinem der Drillinge vor. Die entnommenen Blutkulturen aller drei Kinder waren negativ. Letztendlich wäre aber eine Infektion mit *Bacillus licheniformis* als Verursacher der Frühgeburtslichkeit nicht auszuschließen, da es sich um einen plazentotropen Keim handelt und er bei Rindern Aborte verursachen kann. Die Plazenta wurde jedoch nicht untersucht, außerdem ließ sich der Keim in keiner der Blutkulturen nachweisen. Als Infektionsweg wurde bisher von einer hämatogenen Streuung mit transplazentarer Übertragung ausgegangen <sup>(1, 2, 3)</sup>. Dabei wären jedoch im vorliegenden Fall aufgrund des Plazentotropismus vermutlich die anderen beiden Kinder auch infiziert gewesen. Da es sich nicht um eineiige Drillinge handelt, könnte der *Bacillus* seinen Weg auch nur über eine Plazenta gefunden haben, über diese Möglichkeit ist in den bisherigen Studien nichts beschrieben. In den Unterlagen über Kind Nr. 11 war keines der genannten Symptome, die bei den Rindern gefunden wurden beschrieben, das C-reaktive Protein war nur leicht erhöht. Das Kind wurde nach Geburt über drei Tage antibiotisch mit Ampicillin und Gentamycin behandelt.

In einer Studie von Rowan et al. wurde *Bacillus licheniformis* in zubereiteter Säuglingsnahrung nachgewiesen, die über mehrere Stunden bei 25°C inkubiert wurde<sup>(78)</sup>. Die untersuchten Nahrungspräparate unterschieden sich jedoch von der Nahrung, die den Kindern in der vorliegenden Studie verabreicht worden war (Alfaré® und Prematil®). Zudem wurden sowohl Alfaré® als auch Prematil® molekularbiologisch untersucht, ohne dass bakterielle DNA nachgewiesen werden konnte.

Der ebenfalls bei Kind Nr. 11 angezüchtete *Paenibacillus lactis* ist verwandt mit der Gattung *Bacillus* sp. Es handelt sich um sporenbildende, aerobe und fakultativ anaerobe grampositive Bakterien, die hauptsächlich im Boden oder im Wasser vorkommen. Die gegen viele äußere Einflüsse resistenten Sporen können viele Bereiche kontaminieren. *Paenibacillus* sp. wurde z.B. bei Meningitis, Endophthalmitis, Protheseninfektion, Wundinfektionen, Rinder- und Schafaborten gefunden<sup>(67)</sup>.

Bei *Fusobacterium nucleatum* handelt es sich um ein gramnegatives, anaerobes Bakterium, das normalerweise zur Mikrobiota im Bereich der Mundhöhle, der oberen Atemwege und des Darmtraktes gehört. Unter den Fusobakterien zählt es zu den häufigsten Verursachern vor allem pleuropulmonaler Infektionen, auch kann es bei Infektionen der weiblichen Genitale, der Weichteile und der Mundhöhle vorkommen<sup>(15, 67)</sup>. *Fusobacterium nucleatum* wurde vereinzelt in der Studie von Mourani et al. in Trachealsekret von Frühgeborenen nachgewiesen<sup>(65)</sup>. Als Auslöser einer früheinsetzenden Sepsis wurde das Bakterium von Wang et al. beschrieben, im Rahmen einer Spätform von Brook<sup>(15, 101)</sup>. Darüber hinaus wurde *Fusobacterium nucleatum* mehrfach im Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit, Chorioamnionitis und Amnioninfektionssyndrom gefunden, wobei als Übertragungsweg sowohl ein hämatogener, z.B. bei periodontalen Entzündungen, als auch ein vaginal aufsteigender vermutet wurden. Als Ursprungsort des Bakteriums wurde die Mundhöhle gesehen<sup>(12, 31, 39, 101)</sup>. Beachtenswert scheint, dass *Fusobacterium nucleatum* sowohl aus dem Mekonium als auch aus dem Trachealsekret desselben Kindes (Kind Nr. 8) bei Vorliegen einer konnatalen Sepsis und Frühgeburt durch vorzeitige Wehentätigkeit nachgewiesen wurde.

Bei den Kindern Nr. 7 und Nr. 16 wurde *Propionibacterium acnes* im Mekonium nachgewiesen. Bei diesem Keim handelt es sich um ein grampositives, anaerobes Stäbchenbakterium, und er stellt einen der häufigsten Hautkeime des Menschen dar.



*Propionibacterium acnes* ist an der Entstehung von Acne vulgaris und Abszessen beteiligt <sup>(43)</sup>, wird darüber hinaus auch im Nasopharynx, in der Mundhöhle und im Urogenitaltrakt gefunden und kann Endokarditis sowie Prothesen- und Shuntinfektionen verursachen <sup>(74)</sup>. Im Zusammenhang mit Bakteriämie bzw. Sepsis bei Neu- und Frühgeborenen wird das Bakterium von Brook genannt <sup>(15)</sup>. Ein möglicher Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit ergibt sich daraus, dass *Propionibacterium acnes* über Prostaglandinähnliche Substanzen eine Kontraktion von glatten Muskelzellen der menschlichen Adnexe bewirken kann <sup>(41)</sup>. Auch wurde von Reed et al. der Fall einer Frühgeburt in der 25. Schwangerschaftswoche beschrieben, bei der *Propionibacterium acnes* im Fruchtwasser und in den mütterlichen Blutkulturen nachgewiesen werden konnte. Der Infektionsweg bei diesem Fall wurde als aufsteigender vermutet, möglicherweise auch im Rahmen einer zuvor durchgeführten Fetoskopie <sup>(74)</sup>. Mändar et al. wiesen im Fruchtwasser einer asymptomatischen Schwangeren im mittleren Trimenon ebenfalls *Propionibacterium acnes* nach, konnten jedoch eine Kontamination im Rahmen der transabdominalen Amniozentese nicht ausschließen <sup>(58)</sup>. Bei Kind Nr. 7 wurde als Grund für die Frühgeburtlichkeit ein pathologisches CTG und fetal distress angegeben, gleichzeitig lag eine Plazenta praevia vor, die bereits zu Blutungen geführt hatte. Auch bei Kind Nr. 16 war die Ursache für die Frühgeburtlichkeit ein pathologisches CTG. Eine konnatale Sepsis oder ein Amnioninfektionssyndrom wurde bei keinem der beiden Kinder diagnostiziert, auch lag keine vorzeitige Wehentätigkeit oder ein Blasensprung vor. Das unterschiedliche Ergebnis bei Kind Nr. 16 aus derselben Bakterienkolonie - *Enterococcus faecium* aus der Sequenzierung der Bakterienkultur und *Propionibacterium acnes* aus dem DHPLC-Sammellauf - kann durch die unterschiedlichen verwendeten Primer erklärt werden. Die Untersuchung der Probe mit DHPLC erfolgte zudem nach Umstellung der Sequenzierungsmethode, wodurch deutlich bessere Sequenzierungsergebnisse erzielt wurden. Das validere Ergebnis erscheint in diesem Fall *Propionibacterium acnes*.

Im Mekonium von Kind Nr. 9 konnte *Achromobacter xylosoxidans* angezüchtet werden. Hierbei handelt es sich um einen aeroben, gramnegativen Keim, der im Wasser lebt und als opportunistischer Keim bei nosokomialen Infektionen von Kindern beschrieben wurde. Beim Neugeborenen verursacht er eine zumeist tödlich verlaufende Meningitis. Auch wurde ein Fall beschrieben, in dem *Achromobacter xylosoxidans* am ehesten

aufsteigend von der Mutter über eine Chorioamnitis auf das ungeborene Kind übertragen wurde. Dabei zeigte das im Rahmen der mütterlichen Infektion frühgeborene Kind (27./28. Schwangerschaftswoche) neben pulmonalen, intraventrikulären und gastrointestinalen Hämorrhagien eine Sepsis. In den kindlichen und mütterlichen Blutkulturen konnte *Achromobacter xylosoxidans* nachgewiesen werden, unregelmäßiger Nachweis dieses Bakteriums in Vaginalabstrichen wurde beschrieben <sup>(40)</sup>. Im vorliegenden Fall wurde bei Kind Nr. 9 der Verdacht auf eine konnatale Sepsis gestellt, zwei Blutkulturen waren negativ. Bei Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom war das Fruchtwasser klar. Hinweise für eine Meningitis fanden sich nicht. Bei dem Zwillingsbruder ließ sich das Bakterium nicht nachweisen, auch bei ihm waren die Blutkulturen negativ, und er zeigte das Bild einer konnatalen Sepsis bei Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom.

Bakterien der Spezies *Leuconostoc citreum* finden sich normalerweise in der Nahrung und in Pflanzen, können aber auch im Darmtrakt auftauchen. Es handelt sich um grampositive, aerobe, Vancomycin-resistente kokkoide Bakterien. Sie sind im Zusammenhang mit Bakteriämie in Liquor, Peritonealdialysat und Wundabstrichen gefunden worden. Darüber hinaus wurden sie als opportunistische Erreger bei verschiedenen Infektionen beschrieben. Neugeborene scheinen eine Prädisposition für eine Bakteriämie durch *Leuconostoc sp.* zu haben und diese über die Geburtswege zu erlangen <sup>(67)</sup>. Sowohl Yossuck et al. als auch Janow et al. beschreiben das Auftreten einer späteinsetzenden Sepsis bei Frühgeborenen durch *Leuconostoc sp.*, am ehesten verursacht durch zentrale Venenkatheter <sup>(47, 105)</sup>. Bei Kind Nr. 3, bei dem das Bakterium im Mekonium gefunden wurde, lag eine konnatale Sepsis vor, die Blutkulturen waren negativ. Auslöser der Frühgeburtslichkeit waren eine vorzeitige Wehentätigkeit und Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom.

Bei *Lactococcus sp.* handelt es sich um einen Streptokokken und Enterokokken genotypisch und phänotypisch ähnliches aerobes, grampositives Bakterium. Es findet sich üblicherweise in Nahrungsmitteln und Pflanzen, kann aber auch im Darmtrakt vorkommen. Laktokokken werden als Starterkulturen für die Produktion von Milchprodukten wie Käse und Buttermilch verwendet. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Entero- und Streptokokken wird vermutet, dass sich *Lactococcus sp.* in klinischen

Proben öfter als angenommen findet, da es bisher vermutlich häufiger zu phänotypischen Verwechslungen zwischen den verschiedenen Kokken gekommen ist. Darüber hinaus wurde *Lactococcus sp.* neben seiner Rolle als opportunistischer Erreger bei verschiedenen Infektionen auch bei Sepsis gefunden, im Zusammenhang mit Immunsuppression oder sonstiger Schwächung des Patienten <sup>(67)</sup>. Uchida et al. beschrieben einen Fall von Meningitis und Sepsis mit *Lactococcus lactis* bei einem 16 Tage alten Frühgeborenen <sup>(99)</sup>. Bei 46% der Frühgeborenen mit Laktokokken im Mekonium lag eine konnatale Sepsis vor, bei 54% Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom, bei 62% vorzeitige Wehentätigkeit, zum Teil mit vorzeitigem Blasensprung als Ursache der Frühgeburt.

Die grampositive, zur Familie der *Streptococcaceae* gehörende Bakteriengattung *Enterococcus sp.* zählt zur normalen Darmmikrobiota des Menschen, ist aber auch fakultativ pathogener Erreger. Sie findet sich in kleiner Zahl im Genitalbereich und der Mundhöhle und kann vielfältige Infektionen verursachen <sup>(44)</sup>. *Enterococcus faecalis* ist wie *Enterococcus faecium* z.B. als Verursacher von Harnwegsinfekten beschrieben <sup>(43)</sup>. Hufnagel et al. haben in ihrer Studie über die Besiedelung mit *Enterococcus sp.* von Patienten auf einer neonatologischen Intensivstation bereits beschrieben, dass insgesamt 23% der untersuchten Patienten mit *Enterococcus sp.* besiedelt waren. Unter den drei häufigsten Spezies fanden sich *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*, und das Risiko für eine Besiedelung korrelierte mit Frühgeburtlichkeit, niedrigem Geburtsgewicht und mütterlicher Antibiose vor Geburt. Untersucht hatten sie Mekonium und Körperabstriche <sup>(44)</sup>. Fischer et al. beschrieben das Auftreten späteinsetzender Sepsis von Frühgeborenen mit *Enterococcus faecalis* <sup>(29)</sup>. Das begleitende Auftreten einer späteinsetzenden Sepsis bei nekrotisierender Enterokolitis durch einen multiresistenten *Enterococcus faecium* wurde durch Raskind et al. beschrieben <sup>(73)</sup>.

Fünf Tage vor Geburt war im zervikalen Abstrich der Mutter von Kind Nr. 6, bei dem aus Mekonium *Enterococcus faecalis* angezüchtet werden konnte, dasselbe Bakterium nachgewiesen worden. Es kam bei Kind Nr. 6 aufgrund eines Amnioninfektionssyndroms zu vorzeitiger Wehentätigkeit und Blasensprung. Eine Sepsis lag bei dem Kind nicht vor. Auch bei Kind Nr. 16 konnte im Mekonium *Enterococcus faecium* nachgewiesen werden. Es ergaben sich bei diesem Kind keine Hinweise für eine Sepsis

oder ein Amnioninfektionssyndrom. Die Frühgeburt erfolgte hier aufgrund eines pathologischen CTGs.

*Streptococcus sp.* ist ein kugelförmiges, fakultativ anaerobes, grampositives Bakterium mit zahlreichen Spezies, die sich meist in der physiologischen Mikrobiota der menschlichen Haut und Schleimhaut finden. Streptokokken der Lancefield-Gruppe A und B sowie Pneumokokken sind humanpathogen, und verursachen z.B. Pharyngitis, Erysipel, Phlegmone, Neugeborenensepsis, Pneumonie und Otitis media. Orale Streptokokken können Appendizitis und Endokarditiden verursachen und sind an der Bildung von Karies beteiligt. Die anderen Vertreter der Gattung können als opportunistische Erreger in Erscheinung treten <sup>(43)</sup>. Streptokokken der Serogruppe B gehören zu den häufigsten Auslösern der früh einsetzenden Sepsis bei reifen Neugeborenen <sup>(86)</sup>. Han et al. sowie DiGulio et al. fanden im Fruchtwasser bei Frühgeburt neben anderen Bakterien auch Streptokokken <sup>(23, 38)</sup>. Wang et al. konnten im Fruchtwasser, Nabelschnurblut und Blutkulturen von Frühgeborenen mit früh einsetzender Sepsis *Streptococcus agalacticae*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* nachweisen <sup>(101)</sup>. Bei der Hälfte der Frühgeborenen, bei denen *Streptococcus sp.* im Mekonium nachgewiesen wurde, lagen ein Amnioninfektionssyndrom und eine konnatale Sepsis vor. Bei 63% erfolgte die Frühgeburtslichkeit durch vorzeitige Wehentätigkeit, zum Teil mit vorzeitigem Blasensprung.

Das grampositive Bakterium *Staphylococcus hominis* findet sich in der normalen Mikrobiota der Haut und der Schleimhaut und zählt zu den koagulasenegativen Staphylokokken <sup>(43)</sup>. In der Studie von Mourani et al. wurden koagulasenegative Staphylokokken als dominante Spezies in fast der Hälfte der untersuchten Trachealsekrete von beatmeten Frühgeborenen nachgewiesen <sup>(65)</sup>. *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus* konnte bei Neugeborenen mit einer Spätform der Sepsis nachgewiesen werden und wurde als wichtiger nosokomialer Keim bei Neugeborenen bewertet <sup>(17)</sup>. Koagulasenegative Staphylokokken wurden von Härtel et al. als die häufigsten Bakterien im Zusammenhang mit einer späteinsetzenden Sepsis bei sehr kleinen Frühgeborenen beschrieben <sup>(37)</sup>. Dem entspricht der Nachweis von koagulasenegativen Staphylokokken bei Kind Nr. 19 in dessen Blutkultur bei konnataler Sepsis, darüber hinaus wurden bei fünf weiteren Kindern im Verlauf ihres Aufenthaltes in deren

Blutkulturen koagulasenegative Staphylokokken gefunden. DiGulio et al. konnten koagulasenegative Staphylokokken im Fruchtwasser bei Frühgeburt nachweisen <sup>(23)</sup>. Das Kind (Nr. 22), bei dem *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus* im Trachealsekret gefunden wurde, hatte eine konnatale Sepsis, jedoch keinen Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom. Die Blutkultur war negativ, die Frühgeburtlichkeit war durch ein HELLP-Syndrom der Mutter bedingt.

*Enterobacter sp.*, *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens* und *Escherichia sp.* zählen zur Familie der *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* sind gramnegative und fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und einige aus dieser Familie stellen einen Großteil der Stuhlmikrobiota. Auch stellen sie mit ca. 50% die Hauptverursacher nosokomialer Infektionen <sup>(43)</sup>. Sowohl Stark et al. als auch Sakata et al. wiesen in ihren Studien bei Frühgeborenen eine Besiedelung des Mekoniums mit *Enterobacteriaceae* nach <sup>(80, 90)</sup>. Eine späteinsetzende Sepsis bei Frühgeborenen durch unter anderem *Enterobacter cloacae* und *E.coli* wurde von Fischer et al. und Härtel et al. beschrieben <sup>(29, 37)</sup>. Liu et al. beschrieben eine späteinsetzende Sepsis bei Frühgeborenen auf einer Intensivstation durch Übertragung von *Enterobacter cloacae* zwischen den einzelnen Frühgeborenen. Sie führten dies auf eine Patientenüberbelegung der Intensivstation bei gleichzeitiger pflegerischer Unterversorgung zurück. Als begünstigende Faktoren für das Auftreten der Sepsis mit *Enterobacter cloacae* bewerteten sie die intensive antibiotische Behandlung und die Schwächung des Organismus durch die Frühgeburtlichkeit <sup>(55)</sup>. Von Tsai et al. wurde *E.coli* als Verursacher einer früheinsetzenden Sepsis bei Frühgeborenen beschrieben. Als Risikofaktor dafür benannten sie einen vorzeitigen Blasensprung <sup>(98)</sup>. Han et al. und Wang et al. fanden neben anderen Bakterien auch *E.coli* im Fruchtwasser bei Frühgeburt, bei Wang et al. in Verbindung mit einer Frühform der Sepsis des Frühgeborenen <sup>(38, 101)</sup>.

Insgesamt konzentriert sich die Studienlage zur Untersuchung von Trachealsekreten in der Mehrzahl auf Infektionen des Respirationstraktes bei beatmeten Neugeborenen mit *Ureaplasma sp.* und *Mycoplasma sp.*, da ein Zusammenhang mit bronchopulmonaler Dysplasie vermutet wird <sup>(10, 19)</sup>. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurde dabei Spezies-spezifische PCR durchgeführt, was eine mögliche Erklärung dafür sein könnte,

warum bei keinem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kinder die relativ häufig vorkommenden Ureaplasmen nachgewiesen werden konnten.

Vergleicht man die im Mekonium nachgewiesenen Bakterien mit den Ergebnissen aus früheren Studien, zeigt sich Folgendes:

Bei Sakata et al. zeigten sich bei den Frühgeborenen (entbunden in der 25.-34. Schwangerschaftswoche) bereits am ersten Lebenstag hauptsächlich *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus sp.* <sup>(80)</sup>. Stark und Lee untersuchten Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 30-35 Schwangerschaftswochen. In den ersten beiden Lebenstagen zeigten 40% der Frühgeborenen im Mekonium *Bacteroides sp.*, etwa halb so viele *Clostridium sp.* Auch ließen sich in den ersten beiden Lebenstagen bei den Frühgeborenen *Enterobacteriaceae* und *Enterococcus sp.* nachweisen. Die Kinder erhielten Muttermilch als Nahrung <sup>(90)</sup>. Long und Swenson untersuchten innerhalb ihres Patientenkollektivs von 96 Kindern Frühgeborene, die zwischen der 31. und der 37. Schwangerschaftswoche vaginal entbunden worden waren. Es wurden keine Antibiotika verabreicht. Im Vergleich zu Termingeborenen wiesen die Frühgeborenen häufiger anaerobe Bakterien innerhalb der ersten 48h auf. Die Kinder erhielten keine Antibiotika <sup>(56)</sup>. Alle genannten, konventionelle mikrobiologische Methoden nutzenden Studien unterscheiden sich von der vorliegenden Arbeit entweder durch Gestationsalter der untersuchten Kinder, Geburtsmodus, Ernährung oder die Verabreichung von Antibiotika und können daher nur bedingt für einen Vergleich herangezogen werden.

Die bisherige Studienlage zu molekularen Untersuchungen von Mekonium ist gering. Es finden sich vereinzelt Studien, in denen Stuhl von Frühgeborenen untersucht wurde <sup>(22, 61, 85)</sup>, ohne dass explizit die Ergebnisse von Mekoniumuntersuchungen dargelegt werden. De la Cochetière et al. untersuchten die Darmmikrobiota von Frühgeborenen auf mögliche pathogene Keime für NEC und fanden dabei einen Zusammenhang mit *Clostridium perfringens*. Sie verwendeten dabei die TGGE zur Untersuchung der polymikrobiellen Kulturen. Ihnen fiel auf, dass innerhalb der ersten beiden Wochen bei Frühgeborenen eine geringe Diversität der vorgefundenen Keime vorlag <sup>(22)</sup>. Schwiertz et al. untersuchten Mekonium- und Stuhlproben von Frühgeborenen mittels DGGE. Auch dabei zeigte sich bis zum dritten Tag eine im Vergleich zu reifen Neugeborenen geringe intraindividuelle Diversität der vorgefundenen Keime <sup>(85)</sup>. Stewart et al. wiesen mit kulturellen Methoden im Mekonium vor allem *Enterococcus sp.* und

koagulasenegative Staphylokokken nach, mit molekularbiologischen Methoden *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Propionibacterium sp.* und *Flavobacterium sp.*, in allen Mekoniumproben ließen sich Bakterien oder deren DNA nachweisen <sup>(93)</sup>.

Gründe für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus molekularbiologischen Untersuchungen und aus der Kultur ergeben sich aus der Tatsache, dass in der Kultur nur die lebensfähigen Organismen anzüchtbar sind, die auf den ausgewählten Nährböden optimale Wachstumsbedingungen vorfinden, wohingegen mit der PCR die gesamte bakterielle DNA der Probe vervielfältigt wird, also auch die der nicht anzüchtbaren oder abgestorbenen Bakterien. Da sich in der DHPLC Peaks von Bakterien mit derselben Retentionszeit überlagern können <sup>(24)</sup>, ist es möglich, dass bei einem Sammel-  
lauf nur die Bakterien-DNA nachgewiesen wird, von der die höchste Konzentration vorliegt. Auch kann bei nahe verwandten Bakterien eine Diskrepanz innerhalb von Gattung und Spezies entstehen, da aufgrund der Anzahl der Basenpaare von maximal 474 die Variabilität begrenzt ist. Bei der Klonierung wurde ein einzelner Klon verwendet, jedoch kann sich in den anderen Klonen die DNA von anderen Bakterien befunden haben <sup>(38)</sup>, womit erklärbar ist, dass sich *Leuconostoc citreum* nicht im DHPLC-Sammellauf des entsprechenden Mekoniums wiederfinden ließ.

Die geringe bakterielle Diversität, von der bei de la Cochetière et al. und Schwiertz et al. berichtet wird <sup>(22, 85)</sup>, ließ sich auch bei den vorliegenden Untersuchungen mit DHPLC bestätigen – die Profile waren dabei interindividuell sehr ähnlich und es zeigten sich pro Kind maximal vier verschiedene Bakterienspezies. Zieht man die kulturelle Diagnostik hinzu, ließen sich pro Kind maximal fünf Bakterienspezies unterscheiden.

Wie von Domann et al. vorbeschrieben, wurden bei mehrfach nachgewiesenen Bakterien spezifische Retentionszeiten deutlich <sup>(24)</sup>. Die Retentionszeiten der Bakterien, die im Mekonium und Trachealsekret nachgewiesen wurden, sind im Anhang aufgeführt.

Für alle im Mekonium und Trachealsekret nachgewiesenen Bakterien außer *Paenibacillus lactis* und *Lactococcus raffinolactis* konnten in der Literatur Zusammenhänge mit Sepsis bei Neu- oder Frühgeborenen gefunden werden. Verbindet man diese Ergebnisse mit dem Vorliegen einer konnatalen Sepsis, zeigt sich bei einzelnen Bakterien eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, Auslöser der Sepsis gewesen zu sein. Deutliche Hinweise finden sich für *Bacillus cereus*, *Fusobacterium nucleatum*,

*Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* und *Escherichia* sp. In Betracht gezogen werden sollten außerdem *Leuconostoc citreum*, *Lactococcus lactis* und *Streptococcus* sp.

Auch aus dem Zusammenhang zwischen klinischen Daten und dem Potential der nachgewiesenen Bakterien, eine Frühgeburt auszulösen, ergeben sich bei einigen Bakterien deutliche ätiologische Hinweise, vor allem bei *Bacillus cereus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Achromobacter xylosoxidans* und *Enterococcus faecalis*. In Betracht gezogen werden sollten außerdem *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus lactis* und *Streptococcus* sp.

Bei Kind Nr. 9 wurde *Bacillus cereus* im Trachealsekret nachgewiesen, *Achromobacter xylosoxidans* im Mekonium. Bei dem Zwillingsbruder Kind Nr. 10 wurde *Bacillus* sp. im Trachealsekret nachgewiesen. Bei beiden Kindern lag eine konnatale Sepsis vor, die Frühgeburt war bedingt durch vorzeitige Wehentätigkeit und Blasensprung, es bestand bei beiden Kindern der Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl *Bacillus cereus* und *Achromobacter xylosoxidans* eine Sepsis verursachen können <sup>(40, 49)</sup>, Neugeborene gegenüber *Bacillus cereus* eine gewisse Empfänglichkeit haben <sup>(67)</sup>, *Achromobacter* darüber hinaus eine Chorioamnionitis verursachen und *Bacillus* sp. im Fruchtwasser bei Frühgeburten gefunden wurde <sup>(23, 40)</sup>, erscheint ein Zusammenhang sehr wahrscheinlich. Obwohl *Achromobacter* nicht im Mekonium des Zwillingsbruders gefunden wurde, wäre es bei zweieiigen Zwillingen denkbar, dass es nur bei einem zu einer Chorioamnionitis gekommen ist. Eine Besiedelung mit *Bacillus cereus* aufgrund von verunreinigten Beatmungsgeräten erscheint unwahrscheinlich, da dieses Bakterium dann bei mehreren Frühgeborenen hätte nachweisbar sein müssen.

Das Kind, in dessen Mekonium und Trachealsekret *Fusobacterium nucleatum* gefunden wurde, zeigte ebenfalls eine konnatale Sepsis, die Frühgeburt erfolgte aufgrund vorzeitiger Wehentätigkeit, ein Amnioninfektionssyndrom lag nicht vor. *Fusobacterium nucleatum* wurde als Auslöser einer Sepsis beschrieben <sup>(15, 101)</sup>, darüber hinaus im Fruchtwasser bei Frühgeburt, Chorioamnionitis und Zervixverkürzung nachgewiesen <sup>(23, 31, 38, 39)</sup>, was einen Zusammenhang in diesem Fall sehr wahrscheinlich macht.

Kind Nr. 6, in dessen Mekonium *Enterococcus faecalis* nachgewiesen wurde, wies keine konnatale Sepsis auf, jedoch Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom. Die



Frühgeburt erfolgte bei vorzeitigem Blasensprung und Wehentätigkeit, während im Cervikalabstrich der Mutter 5 Tage vor Geburt ebenfalls *Enterococcus faecalis* nachgewiesen wurde. Hier könnte ein Zusammenhang dadurch bestehen, dass das Bakterium die Membranen überwunden und das Fruchtwasser besiedelt hat, worüber es im Mekonium nachweisbar wurde. Es könnte aber auch eine Besiedelung des Mekoniums ohne Pathogenitätswert vorliegen, da das Auftreten von Enterokokken im Mekonium vorbeschrieben ist <sup>(44)</sup>.

Bei Kind Nr. 22 wurden im Trachealsekret *Staphylococcus hominis subsp. novobioceticus*, im Mekonium *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens* und *Escherichia sp.* nachgewiesen. Die Frühgeburt erfolgte aufgrund eines pathologischen CTGs bei HELLP-Syndrom, so dass hier kein Zusammenhang zu bestehen scheint. Alle drei nachgewiesenen Bakterien sind bei Sepsis vorbeschrieben – im Rahmen einer späteinsetzenden Form mit nosokomialen Erwerb <sup>(17, 29, 37, 55)</sup>, bei koagulasenegativen Staphylokokken aber auch mit häufigem Auftreten bei der Frühform <sup>(86, 96)</sup>. *E.coli* wurde bei früheinsetzender Sepsis beschrieben <sup>(98, 101)</sup>, jedoch in Verbindung mit besiedeltem Fruchtwasser oder einem vorzeitigem Blasensprung, was beides in diesem Fall nicht vorlag und auch das vorliegende Bakterium nicht bis zur Speziesebene bestimmt werden konnte.

Im Mekonium von Kind Nr. 11, einem Drilling, wurden *Bacillus licheniformis* und *Paenibacillus lactis* nachgewiesen. Bei dem Kind sowie dessen Geschwistern lag keine konnatale Sepsis vor, bei Kind Nr. 11 jedoch Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom. Die Frühgeburt erfolgte aufgrund einer vorzeitigen Wehentätigkeit – dies muss bei einer Drillingsschwangerschaft in der 32. Schwangerschaftswoche jedoch nicht auf eine infektiöse Genese zurückzuführen sein. Da jedoch beide Bakterien zu Aborten bzw. Frühgeburten bei anderen Säugetieren – Rindern und Schafen – führen können <sup>(1, 2, 3, 67)</sup>, *Bacillus sp.* im Fruchtwasser bei Frühgeburten gefunden wurde <sup>(23)</sup> und bei dem entsprechenden Kind ein Amnioninfektionssyndrom vorlag, ist ein Zusammenhang nicht auszuschließen. Bei *Bacillus licheniformis* handelt es sich um einen plazentotropen Keim und bei dreieiigen Zwillingen ist es denkbar, dass nur eine Plazenta betroffen gewesen sein könnte. Die übliche Verabreichung von Antibiotika bei der Mutter bei drohender Frühgeburtslichkeit sowie die rasche antibiotische Behandlung des Kindes könnten erklären, warum das Kind nicht die Symptome gezeigt hat, die für

die infizierten Kälber vorbeschrieben sind <sup>(1, 2, 3)</sup>. *Bacillus licheniformis* ist für das verabreichte Ampicillin sensibel <sup>(16)</sup>.

Das Kind, bei dem *Leuconostoc citreum* nachgewiesen wurde, litt unter einer konnatalen Sepsis, Ursache für die Frühgeburt waren vorzeitige Wehentätigkeit und Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom. Über einen Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit finden sich keine Hinweise in der Literatur, jedoch ist *Leuconostoc* als Auslöser einer Sepsis bei Frühgeborenen beschrieben <sup>(47, 105)</sup>. Die Sepsisfälle waren jedoch eher späteinsetzende Formen aufgrund zentraler Venenkatheter. *Leuconostoc citreum* wurde auch im Mekonium eines gesunden Termingeborenen nachgewiesen <sup>(70)</sup>, so dass im vorliegenden Fall nicht von einem kausalen Zusammenhang auszugehen ist.

Bei insgesamt 13 Kindern ließ sich *Lactococcus* im Mekonium nachweisen, bei acht davon *Lactococcus lactis*. Bei fast zwei Drittel dieser Kinder lag eine vorzeitige Wehentätigkeit vor, bei etwas mehr als der Hälfte ein Amnioninfektionssyndrom. In der Literatur ließen sich keine Hinweise für einen Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit finden. Auch handelt es sich bei den Kindern, bei denen diese Symptome vorlagen, um Kinder, bei denen Bakterien vorgefunden wurden, die damit eher in Zusammenhang gebracht werden können (*Leuconostoc citreum*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans*). Bei 46% der Kinder lag eine konnatale Sepsis vor, und eine Sepsis mit *Lactococcus lactis* wurde in der Literatur beschrieben <sup>(99)</sup>. Dabei handelte es sich jedoch um eine späteinsetzende Form, die Herkunft des Bakteriums blieb ungeklärt. Auch handelt es sich bei den Kindern mit konnataler Sepsis um die oben genannten Kinder, bei denen deutlich pathogenere Bakterien gefunden wurden. Park et al. beschrieb bereits den Nachweis von *Lactococcus lactis* im Mekonium eines reifen Neugeborenen, das mit Ersatzmilch ernährt wurde <sup>(70)</sup>. Bei den Spezialnahrungen, die den allen Frühgeborenen zum Zeitpunkt der Mekoniumentnahme verabreicht wurden, handelt es sich um Alfaré<sup>®</sup>, bei zwei Kindern um Prematil<sup>®</sup>. Beide Spezialnahrungen enthalten Molkeneiweiß. Da *Lactococcus lactis*, ebenso wie *Leuconostoc sp.*, unter anderem für die Herstellung von Käse eingesetzt wird <sup>(68, 81)</sup>, und Molke ein Nebenprodukt der Käseherstellung ist, wäre die Nahrung eine denkbare Quelle. Da per DHPLC alle Bakterien – vitale und abgestorbene – nachgewiesen werden, könnte es sich auch um im Rahmen des Herstellungsprozesses abgetötete Bakterien handeln. Auch wurde *Lactococcus lactis* in der Vaginalmikrobiota beschrieben <sup>(30)</sup>. Obwohl die Frühgeborenen alle per Sectio

caesarea entbunden wurden, wäre es denkbar, dass sie bei einem vorzeitigen Blasensprung oder durch Membranpassage des Bakteriums *Lactococcus lactis* erworben haben könnten. Da aber *Lactobacillus* den Hauptanteil der Vaginalmikrobiota ausmacht, müsste in diesem Fall auch *Lactobacillus* nachweisbar gewesen sein müssen.

Auffallend ist, dass bei allen genannten Kindern trotz konnataler Sepsis und Amnioninfektionssyndrom die Blutkulturen negativ waren. Demgegenüber steht der Nachweis im Mekonium und Trachealsekret von Bakterien, die als Auslöser der Sepsis in Frage kommen. Damit scheint die Kombination aus Kultur und PCR/DHPLC eine geeignete Methode zu sein, um die Sepsisdiagnostik zu ergänzen. So wäre es in Zukunft empfehlenswert, bei Frühgeborenen mit konnataler Sepsis Mekonium und Trachealsekret mit dieser Methode auf sepsisauslösende Bakterien zu untersuchen. Aufgrund der in allen Fällen nur geringen Zahl an angezüchteten Bakterien sollten diese Untersuchungen mit einer leistungsstarken PCR durchgeführt werden, um eine DNA-Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze der DHPLC zu erhalten. Berechnungen ausgehend von der Anzahl der angezüchteten Bakterien zeigten, dass die Bakterienkonzentration im Mekonium unterhalb der Nachweisgrenze mit konventioneller PCR von  $3 \times 10^4$  CFU für die DHPLC lag <sup>(24, 84)</sup>. Wenn man davon ausgeht, dass 10 µl eines 1:1 Gemisches aus Mekonium und NaCl-Lösung (1g in 1ml) ausgestrichen wurden und daraufhin auf der Agarplatte 1-3 Bakterienkolonien wuchsen, befanden sich im Mekonium-Gemisch insgesamt ca.  $3 \times 10^2$  CFU. In der vorliegenden Arbeit wurde ein aussagekräftigeres Ergebnis für Mekonium und Trachealsekret durch die Verwendung des piko<sup>®</sup> Thermal Cycler erzielt, nachdem unter Verwendung der konventionellen PCR zunächst selbst in kulturpositiven Proben kein peak in der DHPLC generiert werden konnte.

Bei den nachgewiesenen Bakterien, insbesondere bei denen, die sich auch in der Hautmikrobiota finden, ist eine Kontamination während des Zeitpunkts der Entnahme oder bei der Verarbeitung nicht gänzlich auszuschließen. Dies betrifft insbesondere *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Propionibacterium acnes*. Soweit es die Verarbeitung der Proben betrifft, wurden sämtliche Extraktionsschritte unter einer Laminar Flow (Sicherheitswerkbank) unter Verwendung von sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt. Auch wurde der Arbeitsplatz vor jeder Extraktion mit 70%igem Alkohol gereinigt. Für

die Herstellung der Mastermixe für die PCR wurde eine spezielle Sicherheitswerkbank verwendet, unter der keine DNA-Extrakte verarbeitet werden.

Gegen eine Kontamination mit *Streptococcus* spricht, dass dieses Bakterium in mehreren Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten eintrafen, unabhängig voneinander nachgewiesen wurde. Bei *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus* ist eine Kontamination nicht auszuschließen <sup>(7, 103)</sup>, jedoch handelt es sich auch um einen sepsisverursachenden Keim <sup>(17)</sup>, der bei einem Kind mit konnataler Sepsis gefunden wurde. Zudem wurde er aus Trachealsekret extrahiert – in diesem Material ist das Auftreten dieses Bakteriums bereits vorbeschrieben <sup>(65)</sup>. Bei *Propionibacterium acnes* spricht für eine Kontamination, dass bei beiden Kindern weder eine konnatale Sepsis, noch ein Amnioninfektionssyndrom oder vorzeitige Wehentätigkeit vorlagen. Jedoch beschrieben Mändar et al. ein Auftreten von *Propionibacterium acnes* auch bei asymptomatischen Schwangeren im Fruchtwasser <sup>(58)</sup>. Obwohl von van der Zwet et al. Kontaminationen durch *Bacillus cereus* beschrieben wurden <sup>(100)</sup>, erscheint in Anbetracht der klinischen Parameter und des Auftretens von *Bacillus* bei beiden Zwillingen eine Kontamination unwahrscheinlich.

Die kulturelle Anzucht von insgesamt 112 wöchentlich gesammelten Stuhlproben ergab in der ersten Lebenswoche bei zwei Dritteln der Kinder ein Bakterienwachstum, ab der sechsten Lebenswoche waren alle Kinder besiedelt. In der ersten Lebenswoche ließen sich Anaerobier und *Klebsiella sp.* nachweisen, ab der zweiten Lebenswoche kamen *Enterococcus sp.*, koagulasenegative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* und *Citrobacter sp.* hinzu. Von Beginn an machten Anaerobier den größten Anteil der Stuhlmikrobiota aus, ab der sechsten Lebenswoche ließen sie sich bei allen Kindern nachweisen. Hierbei muß beachtet werden, dass auf Schaedler-agar auch fakultativ anaerobe Bakterien, wie z.B. *Enterobacteriaceae* wachsen.

In der zweiten und dritten Lebenswoche ließ sich bei einem Viertel der Kinder *Enterococcus faecalis* nachweisen, bei einem Fünftel *Staphylococcus sp.* *Enterococcus sp.* fand sich bei insgesamt mehr als der Hälfte aller Stuhlproben, wobei in den ersten Lebenswochen mehr *Enterococcus faecalis* nachgewiesen wurde, ab der 15. Lebenswoche häufiger *Enterococcus faecium*. Bei den Staphylokokken handelte es sich hauptsächlich um koagulasenegative Staphylokokken. Bifidobakterien fanden sich keine. *Enterobacteriaceae* ließen sich erst ab der vierten Lebenswoche bei einem

Viertel der Kinder nachweisen, davor traten sie vereinzelt auf. Von den *Enterobacteriaceae* nahm *E. coli* mit 35% aller Proben den Hauptteil ein, gefolgt von *Enterobacter cloacae* mit 26%. Bei 9% aller Proben fand sich *Klebsiella sp.* - bei drei Kindern gehäuft, sonst eher vereinzelt. Insgesamt fiel auf, dass die Anzahl der verschiedenen Spezies innerhalb der *Enterobacteriaceae* mit zunehmender Lebenswoche abnahm. Insgesamt stieg die Gesamtzahl der Bakterienspezies pro Woche bis zur fünften Woche stetig an, wie in der Studie von Gewolb et al. beschrieben, danach war ein allmählicher Abstieg zu verzeichnen <sup>(33)</sup>. Dies könnte bedeuten, dass sich im Verlauf eines längeren Krankenhausaufenthaltes die Darmmikrobiota der Kinder zunehmend einander angleicht und damit die interindividuelle Vielfalt abnimmt, wie bereits von Schwiertz et al. vor-beschrieben <sup>(85)</sup>.

Das frühe und gehäufte Auftreten von Anaerobiern wurde bereits von Blakey et al., Stark und Lee sowie Long und Swenson vorbeschrieben. Bei Stark und Lee fanden sich bei Frühgeborenen vor allem fakultativ anaerobe Bakterien (*Enterobacteriaceae* und *Enterococcus sp.*) deutlich erhöht <sup>(11, 56, 90)</sup>. Eine ähnliche Entwicklung fand sich bei Termingeborenen, die mit Ersatzmilch gefüttert wurden. In der vorliegenden Studie wurden alle Frühgeborenen in den ersten Lebenstagen mit Ersatzmilch gefüttert, was die Ergebnisse von Stark und Lee potenzieren könnte, da die Verabreichung von Ersatzmilch zu einer Zunahme von Anaerobiern führen kann <sup>(27)</sup>.

In der Studie von Sakata et al. wird beschrieben, dass bei Frühgeborenen *Enterobacteriaceae* gemeinsam mit *Streptococcus sp.* bis zum 20. Lebenstag die dominante Bakterienart im Stuhl stellt <sup>(80)</sup>. Ersteres stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, vor allem wenn man berücksichtigt, dass gemäß der DHPLC-Ergebnisse auch auf Schaedleragar hauptsächlich *Enterobacteriaceae* gewachsen sind. Dass *E. coli* innerhalb der *Enterobacteriaceae* den Hauptteil einnimmt, findet sich auch bei Blakey et al. und Sakata et al., wohingegen bei Goldmann et al. *E. coli* zwar häufig vorkommt, von der gemeinsamen Gruppe *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* und *Citrobacter sp.* jedoch an Häufigkeit übertroffen wird <sup>(11, 35, 80)</sup>. Allerdings gilt dies nicht für die Gruppe der Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht <1.500g, die einen Großteil der vorliegenden Studie ausmachen (80%). Wie in der Studie von Gewolb et al. nahmen von Geburt an die gramnegativen Bakterien den Großteil der Stuhlmikrobiota ein und lösten die grampositiven im Verlauf fast gänzlich ab <sup>(33)</sup>. Das Auftreten von *Klebsiella*

*sp.* wurde bei Frühgeborenen beschrieben und hängt vermutlich mit dem oft langen Aufenthalt im Krankenhaus zusammen <sup>(9, 27)</sup>. Wenig Zusammenhang mit dem Auftreten von *Enterobacteriaceae* scheint mit der verabreichten Nahrung zu bestehen <sup>(92)</sup>.

Wie in der vorliegenden Arbeit machten auch in der Studie von Goldmann et al. und Gewolb et al. innerhalb der Gruppe der Staphylokokken die koagulasenegativen den Hauptanteil aus <sup>(33, 35)</sup>. Von El-Mohandes et al. wurde beschrieben, dass bei gestillten Frühgeborenen häufiger *Staphylococcus epidermidis* zu finden ist, der in diesen Fällen auch öfter als Verursacher einer Sepsis auftrat <sup>(26)</sup>. In der vorliegenden Studie fand sich bei insgesamt fünf Kindern im Verlauf *Staphylococcus sp.* – bei vier dieser Kinder ließen sich diese unter Ernährung mit Muttermilch nachweisen. Das einzige Kind, bei dem insgesamt dreimal im Verlauf *Staphylococcus sp.* angezüchtet werden konnte, erhielt jedoch über diesen Zeitraum Ersatzmilch (Alfaré<sup>®</sup> und Prematil<sup>®</sup>). In den anderen Fällen wurde *Staphylococcus sp.* maximal zweimal im Verlauf nachgewiesen. Bei Gewolb et al. zählten Staphylokokken auch am 30. Tag nach Geburt noch zu den sechs am häufigsten nachgewiesenen Spezies – in der vorliegenden Studie ließen sie sich zwar bis zur achten Woche nach Geburt, aber nur vereinzelt nachweisen. Bei Gewolb et al. wurden zum einen andere Nährböden für die grampositiven Bakterien verwendet, zum anderen kam ein Transportmedium jeweils für grampositive und gramnegative Bakterien zum Einsatz, was zu dem unterschiedlichen Ergebnis geführt haben könnte <sup>(33)</sup>.

Im Gegensatz zu den Studien von Blakey et al., Sakata et al. und Goldmann et al. fanden sich in der vorliegenden Arbeit in keiner Stuhlprobe Streptokokken. Dies könnte zum einen auf die unterschiedliche Auswahl der Nährböden zurückzuführen sein – wobei *Streptococcus sp.* auf Blutagar wächst - zum anderen könnten die in der vorliegenden Studie verabreichten Antibiotika das Fehlen von *Streptococcus sp.* begründen. Lediglich in der Studie von Blakey et al. fand sich vereinzelt eine Antibiotikaverabreichung, in den anderen beiden Studien gar nicht <sup>(11, 35, 80)</sup>.

Ähnlich wie in den Ergebnissen der Studie von Goldmann et al. findet sich in der vorliegenden Arbeit bei der Hälfte der Proben *Enterococcus sp.* <sup>(35)</sup>. Auch Stark und Lee beschrieben eine hohe Anzahl von *Enterococcus sp.* bei Frühgeborenen <sup>(90)</sup>.

*Bifidobacterium sp.* konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Mehrfach ist beschrieben, dass Bifidobakterien den Darm bei Frühgeborenen verzögert und in geringerem Ausmaß besiedeln als im Vergleich zu Termingeborenen. Am Ende

der ersten Lebenswoche konnten diese nur bei 50% der Kinder nachgewiesen werden <sup>(90)</sup>, bzw. erst nach durchschnittlich zehn Tagen, als dominierende Bakterienart nach knapp drei Wochen, jedoch im Vergleich zu Termingeborenen quantitativ um den Faktor zehn verringert. Als Grund hierfür wurde die geringere Milchzufuhr vermutet <sup>(80)</sup>. Dass keine Bifidobakterien über Kultur nachgewiesen werden konnten, könnte an den ausgesuchten Nährmedien liegen, da in früheren Studien andere, z.B. Tomatensaft-Agar, verwendet wurden <sup>(90)</sup>. Zudem unterscheidet sich die Ernährung der Kinder aus früheren Studien (Muttermilch fast ausschließlich von Beginn an) von der in der vorliegenden Arbeit (Alfaré<sup>®</sup> und Prematil<sup>®</sup> in den ersten Lebenstagen). Auch hat im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Frühgeborenen keines der Kinder in den beiden früheren Studien Antibiotika verabreicht bekommen. Ähnliche Untersuchungsbedingungen zeigen sich in der Studie von Gewolb et al., bei der von 29 untersuchten extrem kleinen Frühgeborenen, die mit Antibiotika behandelt wurden, nur bei einem Kind *Bifidobacterium sp.* nachgewiesen werden konnten <sup>(33)</sup>. Insgesamt treten sowohl Laktobacillen als auch Bifidobakterien bei Frühgeborenen seltener auf <sup>(27)</sup>, was mit der antibiotischen Behandlung, der Verabreichung von Ersatzmilch und dem Aufenthalt im Krankenhaus zusammenhängen könnte.

Analog zu dem Anstieg der verschiedenen Bakterienspezies über die Lebenswochen fand sich im Verlauf der ersten sechs Lebenswochen eine Zunahme der Peaks in der DHPLC, wobei in den ersten drei Wochen nur halb so viele Peaks wie angezüchtete Bakterienspezies auftraten. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass sich mehrere Peaks mit derselben Retentionszeit überlagern können <sup>(24)</sup>. Ab der vierten Lebenswoche näherten sich beide Werte einander an, ab der fünften Woche nach Geburt überstieg die Anzahl der Peaks tendenziell die der angezüchteten Bakterienspezies. Dies könnte damit zusammenhängen, dass mit der DHPLC auch Spezies erfasst werden, die nicht angezüchtet werden können. Das heisst, dass in der DHPLC viel mehr Spezies vorliegen als in der Kultur, und ab einer gewissen Speziesvielfalt die Überlagerung innerhalb der Peaks in den Hintergrund tritt.

Bei der Auftrennung einzelner Peaks mit anschließender Sequenzierung fanden sich hauptsächlich *Enterobacteriaceae*, sowie vereinzelt *Veillonella sp.*, *Clostridium sp.* und *Fusobacterium sp.*, die nicht kulturell angezüchtet werden konnten und als Auslöser von Sepsis vorbeschrieben sind <sup>(15)</sup>. Bis auf eine Probe fanden sich in allen DHPLC-

Sammelläufen *Enterobacteriaceae*, unter denen *Enterobacter sp.* den größten Teil ausmachte, gefolgt von *Escherichia sp.* Bei den *Enterobacteriaceae* konnte vereinzelt die DNA nur bis zur Gattungsebene zugeordnet werden. Dies ist bedingt durch die genotypische Ähnlichkeit auf der 16SrDNA-Ebene bei hoher Verwandtschaftlichkeit der *Enterobacteriaceae* untereinander.

Zusätzlich ließen sich per DHPLC bis auf *Clostridium sp.* und *Enterococcus faecalis* nur gramnegative und ausschließlich anaerobe, bzw. fakultativ anaerobe Bakterien, insbesondere *Enterobacteriaceae*, nachweisen. Dies hat möglicherweise zum einen damit zu tun, dass mit Voranschreiten der Lebenswochen die Zahl der gramnegativen Bakterien im Darm die der grampositiven deutlich übersteigt <sup>(33)</sup>, zudem wurden *Enterobacteriaceae* bei Frühgeborenen bereits als dominante Bakterien beschrieben <sup>(90)</sup>. Das gehäufte Auftreten von Anaerobiern und fakultativ anaeroben Bakterien bei Frühgeborenen ist ebenfalls vorbeschrieben <sup>(11, 56, 90)</sup>. Zum anderen sind gramnegative Bakterien aufgrund der Beschaffenheit ihrer Bakterienwand leichter zu amplifizieren als grampositive. Aufgrund eigener Studien ließ sich nachweisen, dass für die verwendete konventionelle PCR eine höhere Nachweisgrenze für grampositive Bakterien vorliegt: für grampositive Bakterien lag diese bei ca. 80 CFU/µl, für gramnegative bei ca. 20 CFU/µl, jeweils im Ausgangsmaterial.

Dafür konnten in der DHPLC im Gegenzug jedoch Bakterien nachgewiesen werden, die auf den Agarplatten nicht angezüchtet werden konnten, wie z.B. *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Cedecea* und *Veillonella*. Bei *Veillonella sp.* handelt es sich um gramnegative anaerobe Kokken, die ebenso wie das anaerobe gramnegative *Fusobacterium sp.* zur Normalmikrobiota der Mundhöhle und des oberen respiratorischen Traktes gehören, aber auch im Gastrointestinaltrakt und der Vaginalmikrobiota gefunden werden <sup>(67)</sup>. *Clostridium sp.* ist ein anaerobes, sporenbildendes grampositives Bakterium, dessen Spezies zum einen schwerwiegende Erkrankungen wie Tetanus, Botulismus und Enterokolitis verursachen können, aber auch – wie *Clostridium difficile* – zur normalen Darmmikrobiota gehören <sup>(67)</sup> und sich auch im Stuhl von Früh- und Neugeborenen finden <sup>(11, 71, 80, 90)</sup>. Dass auch in der DHPLC keine Bifidobakterien nachgewiesen werden konnten, könnte damit zusammenhängen, dass diese bei Frühgeborenen innerhalb der ersten Lebenswochen keine dominante Spezies der Darmmikrobiota darstellen und somit deren Peaks von anderen dominanteren Spezies mit derselben Retentionszeit überlagert werden könnten.



Es gibt bereits einige molekularbiologische Studien zur Entwicklung der Stuhl-mikrobiota bei Frühgeborenen, unter anderem von de la Cochetière et al., Schwiertz et al., Millar et al. und Penders et al., die jedoch in ihren Ergebnissen über die unterschiedlichen Keime wenig Gemeinsamkeiten haben <sup>(22, 61, 71, 85)</sup>. Was sich jedoch in allen Studien zeigt, ist die zunächst geringe Diversität, die im Verlauf ansteigt, sowie der Nachweis von schwer kultivierbaren Keimen aus dem Bereich der *Enterobacteriaceae* und der Anaerobier.

Zur Methode der PCR/DHPLC bei der Untersuchung von Stuhlproben können folgende Überlegungen gestellt werden: In den untersuchten Stuhlproben konnten bis zu vier Bakteriengattungen und bis zu vier –spezies per DHPLC aufgetrennt werden. Sowohl Domann et al. als auch Imirzalioglu et al. konnten bei der Untersuchung von polymikrobiellen Infektionen im Urin bis zu fünf verschiedene Bakterienspezies nachweisen <sup>(24, 45)</sup>. Da im Ausgangsmaterial Stuhl zahlreiche verschiedene Bakterien-spezies vorliegen, von denen bei Erwachsenen mindestens 80% nicht kultivierbar sind <sup>(22)</sup>, ist es vorstellbar, dass die DHPLC ab einer bestimmten Anzahl verschiedener Spezies an ihre Grenzen kommt. Eine mögliche Ursache dabei könnte sein, dass sich Peaks von Bakterien mit derselben Retentionszeit überlagern können <sup>(24)</sup>. Je mehr verschiedene Bakterienspezies vorliegen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit von Überlagerungen, da die Eluierung von der Chromatographiesäule zeitlich begrenzt ist. Neben der hohen Bakteriendiversität finden sich im Stuhl auch Inhibitoren wie Gallensalze, Hämoglobinabbauprodukte und komplexe Polysaccharide, die die Möglichkeiten der PCR aus Stuhlproben limitieren können <sup>(22)</sup>.

Ein weiteres Problem stellte in dieser Arbeit das Fehlen eines Peaks bei kulturpositiven Stuhlproben dar, was bei 12,5% der Proben vorlag. Da dies nur innerhalb der ersten fünf Lebenswochen bei einzelnen Kindern auftrat, die intensiv antibiotisch behandelt worden waren und bei denen auch in der Bakterienkultur nur vereinzelte Kolonien vorlagen, ist davon auszugehen, dass die Bakterienkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze der DHPLC gelegen haben könnte. Für die Verarbeitung der Stuhlproben wurde aus ökonomischen Gründen die konventionelle PCR verwendet, so dass bei Verwendung des effektiveren piko<sup>®</sup> Thermal Cycler - ähnlich wie bei den Mekoniumproben bewiesen - davon auszugehen ist, dass in diesem Fall die PCR der limitierende Faktor gewesen ist.

Bei der Fragestellung möglicher Zusammenhänge zwischen späteinsetzender Sepsis und den Ergebnissen der untersuchten Stuhlproben fiel zunächst auf, dass bei den im Verlauf entnommenen Blutkulturen im Gegensatz zu denen unmittelbar nach Geburt zu einem höheren Prozentsatz Bakterien nachgewiesen werden konnten (11% vs. 37,5%). Dies könnte mit der Verabreichung von Antibiotika – nicht nur bei den Kindern, sondern auch präpartal bei den Müttern – zusammenhängen.

Bei drei von sieben Kindern fiel auf, dass deren Stuhlproben vor Auftreten einer septischen Symptomatik kulturnegativ waren, bei zwei der Kinder zeigten sich auch keine Peaks in der DHPLC. Davon hatten zwei Kinder vorher über mehrere Tage verschiedene Antibiotika bekommen, darunter Vancomycin und Imipenem. Dies ist möglicherweise erklärbar durch die Studie von Stoll et al. und Downey et al., die eine antibiotische Behandlung als Risikofaktor für das Auftreten einer späteinsetzenden Sepsis bei Frühgeborenen nachwiesen <sup>(25, 95)</sup>.

Bei fünf von sechs positiven Blutkulturen ließen sich koagulasenegative Staphylokokken nachweisen, dabei schien bei zwei Kindern die Ursache der Sepsis erklärbar – einmal aufgrund eines Eiterherdes am Fuss und einmal aufgrund eines infizierten Rickham-Reservoirs. Bei einem der sechs Kinder (Kind Nr. 23) fanden sich sechs Tage nach Blutkultur diese Bakterien auch in Stuhlproben, während diese zwei Tage vorher kulturnegativ waren. Im Gegenzug fanden sich bei insgesamt fünf Kindern koagulasenegative Staphylokokken in Stuhlproben, wovon es sich bei einem um das oben beschriebene Kind Nr. 23 mit Sepsis durch dieses Bakterium handelte. Bei einem weiteren dieser fünf Kinder (Kind Nr. 19) bestand eine konnatale Sepsis mit koagulasenegativen Staphylokokken, diese ließen sich noch bis zur achten Woche postnatal in Stuhlproben nachweisen. Die Häufigkeit, mit der im Verlauf eine Sepsis durch koagulasenegative Staphylokokken auftrat, entspricht vorangegangenen Studien, bei denen diese Bakterien einen Großteil der sepsisauslösenden Keime stellten <sup>(95)</sup>. Bei zwei Kindern konnten nach Diagnosestellung weiterhin koagulasenegative Staphylokokken im Darm nachgewiesen werden, so dass dieser als mögliches Reservoir in Betracht kommt. Auffallend ist dabei, dass diese Bakterien trotz adäquater Antibiose weiterhin im Darm nachweisbar blieben. Bei einem weiteren Kind (Nr. 17) konnte das Bakterium, das in der Blutkultur nachgewiesen wurde (*Enterococcus faecalis*), sowohl sechs Tage vor als auch zwei Tage nach Diagnosestellung in Stuhlproben nachgewiesen werden. Dass dieses Bakterium auch nach Diagnosestellung noch im Darm kulturell nachweisbar war,

könnte auch mit dem kurzen Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Entnahme der Stuhlprobe zusammenhängen. Aber auch bei diesem Kind scheint der Darm ein mögliches Bakterienreservoir für die Sepsis gewesen zu sein. Eine Sepsis durch Enterokokken ist ebenfalls vorbeschrieben <sup>(95)</sup>.

Prinzipiell können alle in den Stuhlproben nachgewiesenen Keime Auslöser einer Sepsis insbesondere bei Immunsuppression, längerem Krankenhausaufenthalt, zentralen Venenkathetern etc. sein <sup>(4, 15, 21, 29, 95)</sup>. Vor dem Hintergrund, dass der Darm als Erregerreservoir bei Sepsis vorbeschrieben wurde <sup>(4, 8, 87, 89)</sup>, scheint jedoch die in dieser Arbeit beobachtete Darmmikrobiota bei sehr kleinen Frühgeborenen mit antibiotischer Behandlung und hauptsächlichlicher Ernährung mit Ersatzmilch bedenklich. Dies vor dem Hintergrund, dass anaerobe/fakultativ anaerobe - insbesondere gramnegative *Enterobacteriaceae* - den Hauptteil der hier beschriebenen Darmmikrobiota ausmachten, gefolgt von Enterokokken. Letztere gehören zu den Hauptauslösern einer späteinsetzenden Sepsis bei Frühgeborenen, wohingegen *Enterobacteriaceae* zwar seltener (18%) im Erregerspektrum der Sepsis nachgewiesen werden, aber bei einer Sepsis eine wesentlich höhere Mortalität aufweisen <sup>(25, 95)</sup>. Die als schützend angesehenen Bifidobakterien, die bei Frühgeborenen seltener auftreten <sup>(27)</sup>, konnten in diesem Kollektiv weder kulturell noch molekularbiologisch nachgewiesen werden.

Zusammenfassend und Bezug nehmend auf die Fragestellung kann zu den Ergebnissen Folgendes gesagt werden: Sowohl bei der Untersuchung von Mekonium als auch von Trachealsekret mit kulturellen und molekularbiologischen Methoden konnten Bakterien nachgewiesen werden, die eine früheinsetzende bzw. konnatale Sepsis bei Frühgeborenen auslösen können und/oder die als Auslöser einer Frühgeburt benannt werden. In Verbindung mit den erhobenen klinischen Daten ergaben sich deutliche Hinweise für einen ätiologischen Zusammenhang mit einer Sepsis für *Fusobacterium nucleatum*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans* und *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus*. Drei dieser Bakterienspezies konnten nicht kultiviert werden und wurden nur mit PCR/DHPLC nachgewiesen. *Achromobacter xylosoxidans* wiederum war nur in der Bakterienanzucht nachweisbar, so dass die Kombination von kultureller Anzucht und kulturunabhängiger Methode bei der Untersuchung von Mekonium und Trachealsekret am effektivsten zu sein scheint, wie bereits von DiGulio et al. vorbeschrieben <sup>(23)</sup>. Alle Kinder, bei denen oben genannte Bakterien nachgewiesen

wurden, zeigten ein negatives Blutkulturergebnis, so dass die Kombination von konventionellen mikrobiologischen und kulturunabhängigen Methoden beim Nachweis von sepsisauslösenden Bakterien der Blutkultur überlegen scheint.

Auffallend war der Nachweis von Laktokokken im Mekonium aller Kinder, was möglicherweise mit der verabreichten Nahrung zusammenhängen könnte.

Auch bei den Untersuchungen zur Auslösung der Frühgeburt durch Bakterien konnten ätiologische Zusammenhänge bei *Fusobacterium nucleatum*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Enterococcus faecalis* und *Bacillus licheniformis* gestellt werden, von diesen Bakterien war nur *Enterococcus faecalis* in einem mütterlichen Abstrich vor Geburt festgestellt worden.

Aufgrund dieser Ergebnisse zur konnatalen Sepsis scheint es empfehlenswert, die leicht zugänglichen Materialien Mekonium und Trachealsekret bei Frühgeborenen ergänzend zur Diagnostik bei konnataler Sepsis zu verwenden. Bezüglich der Antibiotikaresistenzen zeigen sich *Bacillus cereus* und *Staphylococcus hominis* gegenüber dem standardmäßig verwendeten Gentamycin sensibel, sowohl *Fusobacterium nucleatum* als auch *Achromobacter xylosoxidans* scheinen jedoch wenig Sensibilität gegenüber den verwendeten Antibiotika zu zeigen. Hier wäre bei *Fusobacterium nucleatum* eine Kombination von Ampicillin mit einem Betalaktamaseinhibitor wirksam, bei *Achromobacter xylosoxidans* Imipenem.

Bei der Untersuchung von wöchentlichen Stuhlproben der extrem Frühgeborenen mit kultureller Anzucht und PCR/DHPLC fiel auf, dass von Beginn an der Hauptanteil der Stuhlflora bei anaeroben bzw. fakultativ anaeroben und gramnegativen Bakterien liegt, vor allem bei *Enterobacteriaceae*. Auch Enterokokken ließen sich in der Hälfte aller Stuhlproben finden, Bifidobakterien hingegen gar nicht. Dies scheint vor dem Hintergrund bedenklich, dass sich Enterokokken gehäuft im Zusammenhang mit einer späteinsetzenden Sepsis finden und *Enterobacteriaceae* – zwar seltener in diesem Rahmen auftretend – insbesondere zu tödlichen septischen Verläufen beitragen. Hier scheint empfehlenswert, weitere Versuche dahingehend zu unternehmen, eine schützende, d.h. eine durch Lactobacillen und Bifidobakterien geprägte Darmmikrobiota auch bei Frühgeborenen aufzubauen, möglicherweise durch eine frühere Verabreichung von Muttermilch oder probiotischen Produkten. Insgesamt ist zur Verwendung der PCR/DHPLC bei der Untersuchung von Stuhl jedoch zu sagen, dass

sie aufgrund der großen Bakteriendiversität im Stuhl bei der Auftrennung an ihre Grenzen kommt und zumindest mit den jetzigen Möglichkeiten nicht mehr als fünf Bakterienspezies in einer Probe analysiert werden können. So scheint auch deren Einsatz bei der Diagnostik der späteinsetzenden Sepsis zwar Hinweise auf mögliche auslösende Bakterien im Hinblick auf die Darmmikrobiota als Erregerreservoir geben zu können, einen engeren ätiologischen Zusammenhang wie bei Mekonium und Trachealsekret nachzuweisen erscheint jedoch eher schwierig.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl sich in den letzten Jahren die Überlebenschancen der sehr kleinen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <32 Schwangerschaftswochen deutlich verbessert haben, ist deren oft langwierige Krankenhausbehandlung häufig mit Komplikationen verbunden. Diese ergeben sich vor allem durch die Unreife der Organsysteme des Frühgeborenen. Infektionen während der Schwangerschaft – vor allem aufsteigende innerhalb des Genitalbereichs der Mutter – gelten als eine der Hauptursachen für eine Frühgeburt, und können sowohl vor als auch nach der Geburt zu einer Sepsis des immungeschwächten Frühgeborenen führen. Auch während des oft langen Krankenhausaufenthaltes kommt es bei Frühgeborenen gehäuft zur Sepsis, dabei umso häufiger, je geringer das Gestationsalter ist. Viele Erreger sind bekannt, jedoch ist ein Erregernachweis mit konventionellen Methoden besonders bei schwer kultivierbaren Bakterien oder bei einer Mischinfektion schwierig, auch aufgrund des geringen Blutvolumens bei Frühgeborenen. Der Goldstandard in der Sepsisdiagnostik – die Blutkultur – ist trotz klinischer Symptomatik in vielen Fällen negativ.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten mit einer neuen, kultivierungsunabhängigen molekularbiologischen Methode, der DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), schwer anzüchtbare Bakterien oder Mischinfektionen in Mekonium und Trachealsekret als mögliche Auslöser einer Frühgeburtslichkeit oder einer konnatalen Sepsis nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte die Entwicklung der Stuhlflora bei sehr kleinen Frühgeborenen mit kultureller Anzucht und DHPLC untersucht werden, auch im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge mit einer späteinsetzenden Sepsis. Dazu wurden Mekonium, Trachealsekret und wöchentliche Stuhlproben von insgesamt 25 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von <32 Schwangerschaftswochen untersucht. Die Bakterien im Untersuchungsmaterial wurden zum einen konventionell mikrobiologisch nachgewiesen, zum anderen molekularbiologisch durch PCR und DHPLC. Darüber hinaus wurden klinische Angaben zu den Kindern und den Umständen der Frühgeburt recherchiert.

Dabei ließen sich in Mekonium und Trachealsekret Bakterien nachweisen, die eine konnatale Sepsis auslösen können. Aus der Verbindung zwischen der Studienlage zu den einzelnen Bakterien und der klinischen Befunde der Kinder ergaben sich die deutlichsten Hinweise für einen kausalen Zusammenhang zur Sepsis für *Fusobacterium nucleatum*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans* und *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus*. In Bezug auf Zusammenhänge zwischen den nachgewiesenen Bakterien und deren möglichem Auslösen der Frühgeburt sind insbesondere *Fusobacterium nucleatum*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Enterococcus faecalis* und *Bacillus licheniformis* hervorzuheben. Die meisten der genannten Bakterien, vor allem aus Trachealsekret, ließen sich nicht anzüchten. Bei allen Kindern fanden sich im Mekonium Laktokokken, die möglicherweise aus der Nahrung mit Ersatzmilch stammen. Die Blutkulturen der Kinder, bei denen oben genannte Bakterien nachgewiesen wurden, waren negativ.

Bei der Untersuchung von 112 Stuhlproben konnten von Beginn an vor allem anaerobe und fakultativ anaerobe - insbesondere *Enterobacteriaceae*, sowie Enterokokken nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten auch Bakterienspezies nachgewiesen werden, die nicht kulturell angezüchtet werden konnten, wie z.B. *Veillonella sp.*, *Clostridium sp.* und *Fusobacterium sp.* und die als Auslöser von Sepsis vorbeschrieben sind. Insgesamt stieg die Anzahl der Bakterienspezies bis zur fünften Lebenswoche stetig an, parallel dazu stieg die Anzahl der Peaks in der DHPLC an. Ab der fünften Woche überstieg die Anzahl der Peaks die Anzahl der angezüchteten Bakterienspezies pro Kind. Mit der DHPLC aus Stuhlproben ließen sich bis zu vier verschiedene Bakteriengattungen und –spezies auftrennen.

Die im Verlauf entnommenen Blutkulturen zeigten dreimal so häufig ein positives Ergebnis wie die Blutkulturen unmittelbar nach Geburt, was mit den verabreichten Antibiotika bei Müttern und Kindern sub partu zusammenhängen könnte. Dabei wurden hauptsächlich koagulasenegative Staphylokokken nachgewiesen, einmalig *Enterococcus faecalis* und *Bacillus cereus*. Bei zwei Kindern mit koagulasenegativen Staphylokokken in der Blutkultur zeigte sich dasselbe Bakterium in anschließenden Stuhlproben. Bei drei Kindern waren bis zu drei Tage vor der Verdachtsdiagnose Sepsis keine Bakterien anzüchtbar, bei zwei war kein Peak in der DHPLC zu sehen. Dies ist

möglicherweise durch die zuvor verabreichten Antibiotika erklärbar, die auch einen Risikofaktor bei der Entwicklung einer Sepsis darstellen.

Insgesamt handelt es sich bei der DHPLC um eine empfehlenswerte Methode zur Ergänzung der Diagnostik bei konnataler Sepsis. Dabei sind die Materialien Mekonium und Trachealsekret leichter verfügbar als Blut, und in der vorliegenden Arbeit konnten damit häufiger sepsisauslösende Bakterien nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Stuhl mit DHPLC konnte der Darm als Erregerreservoir für eine Sepsis durch Anaerobier, *Enterobacteriaceae* und Enterokokken aufgezeigt werden – im Rahmen der Diagnostik zur späteinsetzenden Sepsis scheint die DHPLC aufgrund der großen Bakteriendiversität im Stuhl nur eingeschränkt geeignet.



## 7. Summary

Although the chances of survival for preterm neonates below 32 weeks of gestation have notably improved during the last years, their often longterm hospital care is in many cases accompanied with complications. Most of all, these are induced by the immaturity of the preterms' organic systems. Infections during pregnancy – mainly ascendant in the mothers' genitourinary tract – are considered to be one of the main causes for preterm birth. Before and even after birth, they can cause septicaemia in the immunodeficient preterm neonates. Septicaemia also often appears during the longterm hospital stay - the lower the gestational age the more frequent. Numerous causative pathogens are already known, but the detection of non-cultivable organisms or polymicrobial infections with conventional microbial diagnostics is still difficult, in addition because of the preterms' low blood volume. Blood cultures – the gold standard method in the diagnostic of septicaemia – often show no results despite clinical symptoms.

The aim of this study was to detect non-cultivable bacteria or polymicrobial infections causing early- or late-onset septicaemia or premature birth with a new culture-independent molecular method, the DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography). Therefore, samples of meconium, tracheal aspirate and stool from 25 preterm neonates at a gestational age below 32 weeks were collected and examined with conventional microbial diagnostic and with PCR/DHPLC. Underlying was the idea, that with this culture-independent method it would be able to detect bacteria in meconium or tracheal aspirate, respectively, being related to preterm birth or early-onset septicaemia. A further aim was to extend the common knowledge of the development of the preterm neonates' gut colonization and to examine stool samples for potential causative agents of late-onset septicaemia.

By both conventional and culture-independent methods it was possible to detect bacteria in meconium and tracheal aspirate potentially able to cause early-onset septicaemia. In relation to previous studies and the preterms' clinical results the most causative connection between germ and septicaemia was found for *Fusobacterium nucleatum*,

*Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*. Causal relationship between the detected bacteria and preterm birth was strongest for *Fusobacterium nucleatum*, *Bacillus cereus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus licheniformis*. Most of the above mentioned bacteria, especially from tracheal aspirate, were not cultivable. Furthermore, in meconium samples of all preterm neonates, *Lactococcus* sp. was detectable, probably deriving from food. Any blood cultures taken immediately after birth from preterm neonates colonized with the above mentioned bacteria were negative.

The examination of weekly taken stool samples showed right from the beginning mainly anaerobes, facultative anaerobes – especially *Enterobacteriaceae* - and *Enterococcus* sp. Furthermore, with DHPLC non-cultivated bacteria such as *Veillonella* sp., *Clostridium* sp. and *Fusobacterium* sp. were detected, each of them known as potential causative agent of septicaemia. The number of different bacterial species arised continually until fifth week after birth, as it was with the number of peaks in DHPLC. After the fifth week, the number of peaks exceeded the number of cultivated species per child. With DHPLC it was possible to separate up to four bacterial species in one stool sample.

Blood cultures taken during the hospital stay showed three times as much bacterial growth as it was with the ones taken immediately after birth. This could be related with the administered antibiotics for both mother and child during and after birth. Positive blood cultures mainly showed growth of coagulase-negative staphylococci, as well as *Enterococcus faecalis* and *Bacillus cereus* once each. Two children with positive blood culture for coagulase-negative staphylococci showed the same bacteria in following stool samples. Stool samples of three preterm neonates were culture-negative up to three days before diagnosis of septicaemia. Two of them even showed no peak in DHPLC. This may be caused by previous administered antibiotics, which are also described as a risk factor for developing late-onset septicaemia.

In conclusion, the DHPLC is a recommendable method to complement the diagnostic process during early-onset septicaemia by examining meconium and tracheal aspirate. Both sample materials are easy available, and examined by both culture-dependent and culture-independet methods seem to reveal more often pathogens related to septicaemia

as do blood cultures. Examining of stool samples confirmed the human gut as a potential reservoir for pathogens causing late-onset septicaemia, especially for anaerobes, *Enterobacteriaceae* and enterococci. Due to the wide intestinal bacterial diversity in stool samples the usage of DHPLC for detecting pathogens during septicaemia seems to be limited.

## 8. Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIS	Amnioninfektionssyndrom
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CFU	colony forming unit
CTG	Cardio-Tokographie
DGGE	Denaturing Gradient Gelelectrophorese
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNA	Desoxyribonucleoacid
d.h.	das heisst
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
GG	Geburtsgewicht
ggf.	gegebenenfalls
HWI	Harnwegsinfekt
IP-RP-HPLC	ion-pair reverse-phase liquid chromatography
KBR	Kurze Bunte Reihe
MHC II	major histocompatibility complex II
MM	Muttermund
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
path.	pathologisch
PCR	Polymerase Chain Reaction
(P)PROM	(preterm) premature rupture of membranes
RDS	respiratory distress syndrome
rpm	revolutions per minute
sp.	species
SSW	Schwangerschaftswoche

subsp.	subspecies
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSB	Tryptic Soy Broth
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
vorz.	vorzeitig
WT	Wehentätigkeit
z.B.	zum Beispiel

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2.1: Ursachen der Frühgeburt.....	8
Abb. 2.2: mögliche Infektionswege beim Fetus.....	9
Abb. 2.3: 16S-rDNA aus Mischinfektionen.....	19
Abb. 3.1: Beispiel einer API 20E.....	26
Abb. 3.2: PCR-Programm im Gene Amp PCR-System 9700.....	28
Abb. 3.3: PCR-Programm des piko© Thermal Cycler .....	29
Abb. 3.4: Vorgehensweise für Mekonium- und Stuhlproben .....	33
Abb. 3.5: Vorgehensweise für Trachealsekret .....	33
Abb. 3.6: Molekulares Funktionsprinzip der WAVE-Technologie .....	37
Abb. 3.7: Beispiel eines Chromatogramms.....	37
Abb. 3.8: Komponenten des WAVE.....	38
Abb. 3.9: Beispiel für die Einteilung eines Chromatogramms .....	38
Abb. 4.1: Darstellung Extraktionsmethode von Mekonium mittels DHPLC .....	40
Abb. 4.2: relative Anzahl der vorliegenden Trachealsekrete .....	41
Abb. 4.3: Übersicht Sequenziererergebnisse DHPLC-Peaks der Trachealsekrete .....	43
Abb. 4.4: Gesamtübersicht Ergebnisse Trachealsekret.....	44
Abb. 4.5: Übersicht Sequenziererergebnisse DHPLC-Peaks von Mekonium .....	48
Abb. 4.6: Übersicht Sequenziererergebnisse DHPLC-Peaks von Schaedleragar .....	49
Abb. 4.7: Gesamtübersicht über die Ergebnisse der Mekoniumproben.....	50
Abb. 4.8: relative Anzahl der vorliegenden Stuhlproben pro Lebenswoche .....	52
Abb. 4.9: relative Häufigkeit der angezüchteten Enterokokken .....	54
Abb. 4.10: Relative Häufigkeit der verschiedenen <i>Enterobacteriaceae</i> .....	55
Abb. 4.11: Anzahl der Bakterienspezies pro Lebenswoche.....	56
Abb. 4.12.: Anzahl der Bakterienspezies pro Kind.....	56
Abb. 4.13: Mittlere Peakanzahl im Stuhl pro Lebenswoche.....	58
Abb. 4.14: Gegenüberstellung Anzahl der Peaks und Bakterienspezies.....	58
Abb. 4.15: Darstellung ähnlicher Peakmorphologien bei Mehrlingen.....	59
Abb. 4.16: Übersicht Sequenziererergebnisse DHPLC-Peaks von Stuhlproben .....	60
Abb. 4.17: Übersicht Sequenziererergebnisse DHPLC-Peaks von Schaedleragar .....	62
Abb. 4.18: Darstellung der DHPLC-Kurven vor und nach Sepsis.....	68

Tabelle 3.1: Übersicht klinische u. allgemeine Daten der 25 untersuchten Kinder ...	24
Tabelle 3.2: Überblick der Resistenzlage von <i>Enterococcus faecium</i> und <i>faecalis</i> ...	27
Tabelle 4.1: Gegenüberstellung DNA-Konzentration.....	40
Tabelle 4.2: Übersicht über die im Trachealsekret nachgewiesenen Bakterien.....	43
Tabelle 4.3: Übersicht der aus Mekonium angezüchteten Bakterien .....	46
Tabelle 4.4: Übersicht über das Mikrobiom von Mekonium .....	51
Tabelle 4.5: relative Häufigkeit der angezüchteten Bakterien .....	53
Tabelle 4.6: relative Übereinstimmung Bakterienwachstum und DHPLC-Peak .....	57
Tabelle 4.7: Gegenüberstellung Bakterienwachstum und DHPLC von Stuhl .....	61
Tabelle 4.8: Mikrobiom aus den Stuhlproben der Frühgeborenen im Verlauf.....	63
Tabelle 4.9: Vergleich konnatale Sepsis und Ergebnis der Blutkultur .....	64
Tabelle 4.10: Mikrobiom, Sepsis u. Ursache der Frühgeburt .....	66

## 10. Literaturverzeichnis

- 1) Agerholm, J.S.; Krogh, H.V.; Jensen, H.E.: A retrospective study of bovine abortions associated with *Bacillus licheniformis*. *Journal of Veterinary Medicine* 1995; 42:225-234
- 2) Agerholm, J.S.; Willadsen, C.M.; Nielsen, T.K.; Giese, S.B.; Holm, E.; Jensen, L.; Agger, J.F.: Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine* 1997; 44:551-558
- 3) Agerholm, J.S.; Jensen, N.E.; Dantzer, V.; Jensen, H.E.; Aarestrup, F.M.: Experimental infection of pregnant cows with *Bacillus licheniformis* bacteria. *Veterinary Pathology* 1999; 36:191-201
- 4) Aly, N.Y.; Salmeen, H.N.; Lila, R.A.A.; Nagaraja, P.A.: Pantoea agglomerans bloodstream infection in preterm neonates. *Medical Principles and Practice* 2008; 17: 500-503
- 5) Azizia, M.; Lloyd, J.; Allen, M.; Klein, N.; Peebles, D.: Immune status in very preterm neonates. *Pediatrics* 2012; 129(4): e967-e974
- 6) Behrman, R.E.; Kliegman, R.M.; Jenson, H.B.: Nelson - Textbook of pediatrics, 16th edition 2000; Publisher: Saunders
- 7) Bekhof, J.; Reitsma, J.B.; Kok, J.H., van Straaten, I.H.L.M.: Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. *European Journal of Pediatrics* 2012; DOI 10.1007/s00431-012-1910-6
- 8) Bergman, K.A.; Arends, J.P.; Schölvinck, E.H.: Pantoea agglomerans septicemia in three newborn infants. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2007; 26(5): 453-454
- 9) Bezirtzoglou, E.: The intestinal flora during the first weeks of life. *Anaerobe* 1997; 3: 173-177
- 10) Biernat-Sudolska, M.; Rojek-Zakrzewska, D.; Lauterbach, R.: Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. *Acta biochimica polonica* 2006; 53(3): 609-612
- 11) Blakey, J.L.; Lubitz, L.; Barnes, G.L.; Bishop, R.F.; Campbell, N.T.; Gillam, G.L.: Development of gut colonisation in pre-term neonates. *Journal of Medical Microbiology* 1982; 15: 519-529



- 12) Bohrer, J.C.; Kamemoto, L.E.; Almeida, P.G.; Ogasawara, K.K.: Acute chorioamnionitis at term caused by the oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Hawaii Journal of Medicine and Public Health* 2012; 71(10): 280-281
- 13) Booth, G.R.; Al-Hosni, M.; Ali, A.; Keenan, W.J.: The utility of tracheal aspirate cultures in the immediate neonatal period. *Journal of Perinatology* 2009; 29: 493-496
- 14) BQS – Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung, Düsseldorf. Erhebung 2008. [www.bqs-outcome.de/2008/ergebnisse/leistungsbereiche/geburtshilfe/buaw](http://www.bqs-outcome.de/2008/ergebnisse/leistungsbereiche/geburtshilfe/buaw)
- 15) Brook, I.: The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 2010; 16: 183-189
- 16) Carlisle, G.E; Falkinham, J.O.III: Enzyme activities and antibiotic susceptibility of colonial variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 1989; 55(11): 3026-3028
- 17) Chavez, F.; García-Alvarez, M.; Sanz, F.; Alba, C.; Otero, J.R.: Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(9): 4877-9
- 18) Clarridge, J.E. III: Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology* 2004; 17(4):840-862
- 19) Cultrera, R.; Seraceni, S.; Germani, R.; Contini, C.: Molecular evidence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* colonization in preterm infants during respiratory distress syndrome. *BMC Infectious Diseases* 2006; 6: 166
- 20) Cunliffe, N.A.; Fergusson, S.; Davidson, F.; Lyon, A.; Ross, P.W.: Comparison of culture with the polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotracheal aspirates of preterm infants. *Journal of Medical Microbiology* 1996; 45: 27-30
- 21) da Silva, C.L.P.; Miranda, L.E.V.; Moreira, B.M.; Rebello, D.; Carson, L.A.; Kellum, M.; de Almeida, M.C.L.; Sampaio, J.L.M.; O'Hara, C.M.: *Enterobacter hormaechei* bloodstream infection at three neonatal intensive care units in Brazil. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2002; 21(2): 175-177
- 22) De la Cochetière, M.-F.; Piloquet, H.; Des Robert, C.; Darmaun, D.; Galmiche, J.-P.; Rozé, J.-C.: Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis

- in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatric Research* 2004; 56(3): 366-370
- 23) DiGulio, D.B.; Romero, R.; Amogan, H.P.; Kusanovic, J.P.; Bik, E.M.; Gotsch, F.; Kim, C.J.; Erez, O.; Edwin, S.; Relman, D.: Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS one* 2008; 3(8): e3056
- 24) Domann, E.; Hong, G.; Imirzalioglu, C.; Turschner, S.; Kühle, J.; Watzel, C.; Hain, T.; Hossain, H.; Chakraborty, T.: Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(12):5500-5510
- 25) Downey, L.C.; Smith, P.B.; Benjamin Jr., D.K.: Risk factors and prevention of late-onset sepsis in premature infants. *Early Human Development* 2010; 86 (Suppl 1): 7-12
- 26) El-Mohandes, A.E.; Keiser, J.F.; Johnson, L.A.; Refat, M.; Jackson, B.J.: Aerobes isolated in fecal microflora of infants in the intensive care nursery: Relationship to human milk use and systemic sepsis. *American Journal of Infection Control* 1993; 21:231-4
- 27) Fanaro, S.; Chierici, R.; Guerrini, P.; Vigi, V.: Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica Supplement* 2003; 441: 48-55
- 28) Favier, C.F.; Vaughan, E.E.; De Vos, W.M.; Akkermans, A.D.L.: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and environmental Microbiology* 2002; 68(1): 219-226
- 29) Fischer, D.; Schloesser, R.L.; Nold-Petry, C.A.; Nold, M.F.; Veldman, A.: Protein C concentrate in preterm neonates with sepsis. *Acta Paediatrica* 2009; 98: 526-529
- 30) Gao, Y.; Lu, Y.; Teng, K.-L.; Chen, M.-L.; Zheng, H.-J.; Zhu, Y.-Q.; Zhong, J.: Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *Journal of Bacteriology* 2011; 193(11): 2886-2887
- 31) Gauthier, S.; Tétu, A.; Himaya, E.; Morand, M.; Chandad, F.; Rallu, F.; Bujold, E.: The origin of *Fusobacterium nucleatum* involved in intra-amniotic infection and

- preterm birth. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2011; 24(11): 1329-32
- 32) Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin: Leitlinie Frühgeburt an der Grenze der Lebensfähigkeit des Kindes. 2007 ([www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-019I\\_S2k\\_Fruehgeburt\\_Grenze\\_der\\_Lebensfaehigkeit-2007-12.pdf](http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-019I_S2k_Fruehgeburt_Grenze_der_Lebensfaehigkeit-2007-12.pdf))
- 33) Gewolb, I.H.; Schwalbe, R.S.; Taciak, V.L.; Harrison, T.S.; Panigrahi, P.: Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 1999; 80: 167-173
- 34) Goldenberg, R.L.; Culhane, J.F.; Iams, J.D.; Romero, R.: Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008; 371: 75-84
- 35) Goldmann, D.A.; Leclair, J.; Macone, A.: Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment. *Journal of Pediatrics* 1978; 93(2):288-293
- 36) Greten, H. (Hrsg.): Innere Medizin: verstehen – lernen – anwenden. 11., ergänzte Auflage, 2002, Thieme Verlag
- 37) Härtel, C.; Faust, K.; Avenarius, S.; Bohnhorst, B.; Emeis, M.; Gebauer, C.; Groneck, P.; Heitmann, F.; Hoehn, T.; Hubert, M.; Kribs, A.; Küster, H.; Laux, R.; Mögel, M.; Müller, D.; Olbertz, D.; Roll, C.; Siegel, J.; Stein, A.; Vochem, M.; Weller, U.; von der Wense, A.; Wieg, C.; Wintgens, J.; Hemmelmann, C.; Simon, A.; Herting, E.; Göpel, W.: Epidemic microclusters of blood-culture proven sepsis in very-low-birth weight infants: experience of the German Neonatal Network. *PLoS one* June 2012; Volume 7, Issue 6: e38308
- 38) Han, Y.W.; Shen, T.; Chung, P.; Buhimschi, I.A.; Buhimschi, C.S.: Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(1): 38-47
- 39) Hassan, S.; Romero, R.; Hendler, I.; Gomez, R.; Khalek, N.; Espinoza, J.; Nien, J.K.; Berry, S.M.; Bujold, E.; Camacho, N.; Sorokin, Y.: A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. *Journal of Perinatal Medicine* 2006; 34(1): 13-19
- 40) Hearn, Y.; Gander, R.: *Achromobacter xylosoxidans*, an unusual neonatal pathogen. *American Journal of Clinical Pathology* 1991; 96:211-214

- 41) Hellgren, L.; Lindblom, B.; Vincent, J.; Wilhelmsson, L.: Prostaglandin-like substances in *Propionibacterium acnes*. III. Differential contractile effects on smooth muscle layers of the human utero-tubal junction. *Experientia* 1979; 35:1298-1299
- 42) Hilliard, N.J.; Schelonka, R.L.; Waites, K.B.: *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(7): 3441-3444
- 43) Hof, H.; Dörries, R.: Medizinische Mikrobiologie Duale Reihe, 2. korrigierte Auflage, Thieme Verlag, 2002
- 44) Hufnagel, M.; Liese, C.; Loescher, C.; Kunze, M.; Proempeler, H.; Berner, R.; Krueger, M.: Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infectious Diseases* 2007; 7: 107
- 45) Imirzalioglu, C.; Hain, T.; Chakraborty, T.; Domann, E.: Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia* 2008; 40: 66-71
- 46) Institut für Medizinische Mikrobiologie der Uniklinik Gießen: Arbeitsanleitung zum Praktikum Medizinische Mikrobiologie und Immunologie (Bakteriologischer Teil)
- 47) Janow, G.; Lambert, B.; Scheiner, M.; Rosen, O.; Goldman, D.L.; Soghier, L.: *Leuconostoc* septicaemia in a preterm neonate on Vancomycin therapy: case report and literature review. *American Journal of Perinatology* 2009; 26(1): 89-91
- 48) Jefferson, K.K.: The bacterial etiology of preterm birth. *Advances in Applied Microbiology* 2012; 80: 2-17
- 49) John, A.B.; Razak, E.A.S.A.; Razak, E.E.M.H.; Al-Naqeeb, N.; Dhar, R.: Intractable *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *Journal of Tropical Pediatrics* 2006; 53(2): 131-132
- 50) Knippers, R.: Molekulare Genetik. 8., neu bearbeitete Auflage 2001, Thieme Verlag
- 51) Koletzko, B.: Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage 2004, Springer Verlag
- 52) Kuhn, P.; Dheu, C.; Bolender, C.; Chognot, D.; Keller, L.; Demil, H.; Donato, L.; Langer, B.; Messer, J.; Astruc, D.: Incidence and distribution of pathogens in

- early-onset neonatal sepsis in the era of antenatal antibiotics. *Pediatric and Perinatal Epidemiology* 2010; 24: 479-487
- 53) Lembet, A.; Gaddipati, S.; Holzman, I.R.; Berkowitz, R.L.; Bottone, E.J.: Meconium enhances the growth of perinatal bacterial pathogens. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2003; 70(2):126-129
- 54) Lépine, A.; Michel, F.; Nicaise, C.; Imbert, G.; Vialet, R.; Thomachot, L.; Di Marco, J.-N.; Lagier, P.; Martin, C.: *Bacillus licheniformis* septicaemia in a very-low-birth-weight neonate: a case report. *Infection* 2009; 37(2): 156-158
- 55) Liu, S.-C.; Leu, H.-S.; Yen, M.-Y.; Lee, P.-I.; Chou, M.-C.: Study of an outbreak of *Enterobacter cloacae* sepsis in a neonatal intensive care unit: the application of epidemiologic chromosome profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *American Journal of Infection Control* 2002; 30: 381-5
- 56) Long, S.S.; Swenson, R.M.: Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *Journal of Pediatrics* 1977; 91:298-301
- 57) Madan, J.C.; Salari, R.C.; Saxena, D.; Davidson, L.; O'Toole, G.A.; Moore, J.H.; Sogin, M.L.; Foster, J.A.; Edwards, W.H.; Palumbo, P.; Hibberd, P.: Gut microbial colonization in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 2012; 97: F456-F462
- 58) Mändar, R.; Loivukene, K.; Ehrenberg, A.; Smidt, I.; Raukas, E.; Kask, V.; Mikelsaar, M.: Amniotic fluid microflora in asymptomatic women at mid-gestation. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001; 33: 60-62
- 59) Martius, J.A.; Roos, T.; Gora, B.; Oehler, M.K.; Schrod, L.; Papadopoulos, T.; Groß, U.: Risk factors associated with early-onset sepsis in premature infants. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 85: 151-158
- 60) McMillan, J.A.; DeAngelis, C.D.; Feigin, R.D.; Warshaw, J.B.: Oski's Pediatrics – Principles and Practice, 3<sup>rd</sup> edition 1999, Publisher: Lippincott Williams & Wilkins
- 61) Millar, M.R.; Linton, C.J.; Cade, A.; Glancy, D.; Hall, M.; Jalal, H.: Application of 16S rRNA Gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Journal of clinical microbiology* 1996; 34(10): 2506-2510
- 62) Mitchell, G.; Barton, M.: Bovine abortion associated with *Bacillus licheniformis*. *Australian Veterinary Journal* 1986; 63(5):160-161

- 63) Mitra, S.; Panigrahi, D.; Narang, A.: Anaerobes in neonatal septicaemia: a cause of concern. *Journal of Tropical Pediatrics* 1997; 43: 153-155
- 64) Moll, K.J., Moll, M.: Kurzlehrbuch Anatomie. 16. Auflage 2000, Urban & Fischer Verlag
- 65) Mourani, P.M.; Harris J.K.; Sontag, M.K.; Robertson, C.E.; Abman, S.H.: Molecular identification of bacteria in tracheal aspirate fluid from mechanically ventilated preterm infants. *PLoS One* 2011; 6(10): e25959
- 66) Mshvildadze, M.; Neu, J.; Shuster, J.; Theriaque, D.; Li, N.; Mai, V.: Intestinal microbial ecology in premature infants assessed using non-culture-based techniques. *Journal of Pediatrics* 2010; 156: 20-5
- 67) Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L.; Pfaller, M.A.: Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> edition 2007, Volume 1, Publisher: ASM Press
- 68) Ogier, J.-C.; Casalta, E.; Farrokh, C.; Saïhi, A.: Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 126(3): 286-290
- 69) Ohlin, A.; Bäckman, A.; Ewald, U.; Schollin, J.; Björkqvist, M.: Diagnosis of neonatal sepsis by broad-range 16S real-time polymerase chain reaction. *Neonatology* 2012; 101: 241-246
- 70) Park, H.-K.; Shim, S.-S.; Kim, S.-Y.; Park, J.-H.; Park, S.-E.; Kim, H.-J.; Kang, B.-C.; Kim, C.-M.: Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *Journal of Microbiology* 2005; 43(4): 345-353
- 71) Penders, J.; Thijs, C.; Vink, C.; Stelma, F.F.; Snijders, B.; Kummeling, I.; van den Brandt, P.A.; Stobberingh, E.E.: Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118(2): 511-521
- 72) Pfeleiderer, A.; Breckwoldt, M.; Martius, G.: Gynäkologie und Geburtshilfe, 4. Auflage 2002, Thieme Verlag
- 73) Raskind, C.H.; Dembry, L.-M.; Gallagher, P.G.: Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia and necrotizing Enterocolitis in a preterm neonate. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24(10): 943-944
- 74) Reed, C.S.; Feldman, R.G.; Cochrane, R.M.: Amnionitis caused by *Propionibacterium acnes*. Case report. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1988; 95:626-627

- 75) Reier-Nilsen, T.; Farstadt, T.; Nakstadt, B.; Lauvrak, V.; Steinbakk, M.: Comparison of broad range 16S rDNA and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatrics* 2009; 9:5
- 76) Romero, R.; Gómez, R.; Chaiworapongsa, T.; Conoscenti, G.; Kim, J.C.; Kim, Y.M.: The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2001; 15 (Suppl. 2): 41-56
- 77) Rotimi, V.O.; Duerden, B.I.: The development of the bacterial flora in normal neonates. *Journal of Medical Microbiology* 1981; 14:51-62
- 78) Rowan, N.J.; Anderson, J.G.; Anderton, A.: The bacteriological quality of hospital-prepared infant feeds. *Journal of Hospital Infection* 1997; 36:259-267
- 79) Ryan, A.J.: Abortion in cattle associated with *Bacillus licheniformis*. *Veterinary Record* 1970; 86:650-651
- 80) Sakata, H.; Yoshioka, H.; Fujita, K.: Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European Journal of Pediatrics* 1985; 144(2):186-190
- 81) Samaržija, D.; Antunac, N.; Havranek, J.L.: Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo* 2001; 51(1): 35-48
- 82) Schneider H.; Husslein P.; Schneider K.T.M.: Die Geburtshilfe, 3. Auflage 2006, Springer Verlag
- 83) Schneider H.; Husslein P.; Schneider K.T.M.: Die Geburtshilfe, 4. Auflage 2011, Springer Verlag
- 84) Schrewe, J.: Mikrobiell-metagenomische Analysen explantierter Osteosynthesematerialien mittels PCR/DHPLC und Kultur. Inauguraldissertation Gießen 2012, Institut für Medizinische Mikrobiologie
- 85) Schwartz, A.; Gruhl, B.; Löbnitz, M.; Michel, P.; Radke, M.; Blaut, M.: Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research* 2003; 54(3): 393-399
- 86) Sgro, M.; Shah, P.S.; Campbell, D.; Tenuta, A.; Shivananda, S.; Lee, S.K.: Early-onset neonatal sepsis: rate and organism pattern between 2003 and 2008. *Journal of Perinatology* 2011; 31: 794-798
- 87) Sherman, M.P.: New concepts of microbial translocation in the neonatal intestine: mechanisms and prevention. *Clinical Perinatology* 2010; 37(3): 565-579

- 88) Simon, C.; von Loewenich, V.: Neugeborenen-Infektionen - Bücherei des Pädiaters, Heft 80, 1978, Beiheft zur Zeitschrift „klinische Pädiatrie“
- 89) Soeorg, H.; Huik, K.; Parm, Ü.; Ilmoja, M.; Metelskaja, N.; Metsvaht, T.; Lutsar, I.: Genetic relatedness of coagulase-negative staphylococci from gastrointestinal tract and blood of preterm neonates with late-onset sepsis. *The Pediatric Infectious Disease Journal (Publish ahead of print)*, DOI: 10.1097/INF.0b013e3182791abd
- 90) Stark, P.L.; Lee, A.: The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *Journal of Hygiene* 1982; 89:59-67
- 91) Stauber, M.; Weyerstahl, T.: Gynäkologie und Geburtshilfe, Duale Reihe, 2. Auflage 2005, Thieme Verlag
- 92) Stevenson, D.K.; Yang, C.; Kerner, J.A.; Yeager, A.S.: Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula. *Clinical Pediatrics* 1985; 24(6):338-341
- 93) Stewart, C.J.; Marrs, E.C.L.; Magorrian, S.; Nelson, A.; Lanyon, C.; Perry, J.D.; Embleton, N.D.; Cummings, S.P.; Berrington, J.E.: The preterm gut microbiota: changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatrica* 2012; 101: 1121-1127
- 94) Stoll, B.J.; Hansen, N.; Fanaroff, A.A.; Wright, L.L.; Carlo, W.A.; Ehrenkranz, W.A.; Lemons, J.A.; Donovan, E.F.; Stark, A.R.; Tyson, J.E.; Oh, W.; Bauer, C.R.; Korones, S.B.; Shankaran, S.; Laptook, A.R.; Stevenson, D.K.; Papile, L.; Poole, W.K.: Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *New England Journal of Medicine* 2002; 347(4): 240-247
- 95) Stoll, B.J.; Hansen, N.; Fanaroff, A.; Wright, L.L.; Carlo, W.A.; Ehrenkranz, R.A.; Lemons, J.A.; Donovan, E.F.; Stark, A.R.; Tyson, J.E.; Oh, W.; Bauer, C.R.; Korones, S.B.; Shankaran, S.; Laptook, A.R.; Stevenson, D.K.; Papile, L.; Poole, W.K.: Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110: 285-291
- 96) Stoll, B.J.; Hansen, N.I.; Higgins, R.D.; Fanaroff, A.A.; Duara, S.; Goldberg, R.; Laptook, A.; Walsh, M.; Oh, W.; Hale, E.: Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24(7): 635-639
- 97) Stoll, B.J.; Hansen, N.I.; Bell, E.F.; Shankaran, S.; Laptook, A.R.; Walsh, M.C.; Hale, E.C.; Newman, N.S.; Schibler, K.; Carlo, W.A.; Kennedy, K.A.; Poindexter,



- B.B.; Finer, N.N.; Ehrenkranz, R.A.; Duara, S.; Sánchez, P.J.; O'Shea, M.; Goldberg, R.N.; Van Meurs, K.P.; Faix, R.G.; Phelps, D.L.; Frantz, I.C.; Watterberg, K.L.; Saha, S.; Das, A.; Higgins, R.D.: Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2010; 126(3): 443-456
- 98) Tsai, C.-H.; Chen, Y.-Y.; Wang, K.-G.; Chen, C.-Y.; Chen, C.-P.: Characteristics of early-onset neonatal sepsis caused by *Escherichia coli*. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2012; 51: 26-30
- 99) Uchida, Y.; Morita, H.; Adachi, S.; Asano, T.; Taga, T.; Kondo, N.: Bacterial meningitis and septicaemia of neonate due to *Lactococcus lactis*. *Pediatrics International* 2011; 53(1): 119-120
- 100) van der Zwet, W.C.; Parlevliet, G.A.; Savelkoul, P.H.; Stoof, J.; Kaiser, A.M.; Van Furth, A.M.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.: Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(11): 4131-4136
- 101) Wang, X.; Buhimschi, C.S.; Temoin, S.; Bhandari, V.; Han, Y.W.; Buhimschi, I.A.: Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS one* February 2013; Volume 8, Issue 2, e56131
- 102) Wang, Y.; Hoenig, J.; Malin, K.J.; Qamar, S.; Petrof, E.O.; Sun, J.; Antonopoulos, D.A.; Chang, E.B.; Claud, E.C.: 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME Journal* 2009; 3(8): 944-954
- 103) Weston, E.J.; Pondo, T.; Lewis, M.M.; Martell-Cleary, P.; Morin, C.; Jewell, B.; Daily, P.; Apostol, M.; Petit, S.; Farley, M.; Lynfield, R.; Reingold, A.; Hansen, N.I.; Stoll, B.J.; Shane, A.L.; Zell, E.; Schrag, S.J.: The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2011; 30(11): 937-941
- 104) Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Teng, J.L.L.; Tse, H.; Yuen, K.-Y.: Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 908-934

- 105) Yossuck, P.; Miller-Canfield, P.; Moffett, K.; Graeber, J.: *Leuconostoc spp* sepsis in an extremely low birth weight infant: a case report and review of the literature. *West Virginia Medical Journal* 2009; 105: 24-27

## 11. Anhang

Übersicht über die Retentionszeiten in der DHPLC der in Mekonium und Trachealsekret vorgefundenen Bakterien. Bei Nachweis desselben Bakteriums in mehreren Proben wurden Mittelwerte und Standardabweichung ermittelt. Die angegebenen Werte sind in der Einheit Sekunde angegeben.

Bakterium	peak 1 (s)	peak 2 (s)	peak3 (s)
<i>Lactococcus lactis</i>	$5 \pm 0,22$	$7,85 \pm 0,18$	$8,56 \pm 0,12$
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	$5,54 \pm 0,02$	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	$11,27 \pm 0,16$	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,92	9,67	-
<i>Bacillus cereus</i>	7,44	8,44	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$5,43 \pm 0,01$	$5,73 \pm 0,01$	-
<i>Staphylococcus hominis</i> <i>subsp. novobiosepticus</i>	5,63	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	8,68	-	-
<i>Escherichia sp.</i>	5,74	-	-

## 12. Erklärung zur Dissertation

“ Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertatin stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 13. Danksagung

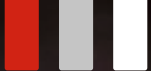
An erster Stelle danken möchte ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Eugen Domann für die Betreuung meiner Promotion, für die interessante Aufgabenstellung sowie für die Bereitstellung der räumlichen, apparativen und materiellen Voraussetzungen zur Bearbeitung der Fragestellung. Besonders danken möchte ich ebenfalls Herrn Professor Dr. rer. nat. T. Chakraborty und seinen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Mikrobiologie für Anregungen und Unterstützung, die sich auf die vorliegende Arbeit positiv ausgewirkt haben.

Mein besonderer Dank gilt Silke Zechel-Gran, die mich während meiner experimentellen Arbeit unterstützte und bei Fragen und Problemen jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Danken möchte ich ihr besonders für ihre unerschöpfliche Geduld, auch wenn sie selbst gerade zeitlich sehr ausgelastet war. Danken möchte ich auch den medizinisch-technischen Assistentinnen des PCR-Labors, allen voran Isabell Trur, die mich zu Beginn der Arbeit in die molekularbiologischen Methoden einwiesen.

Ein großes Dankeschön gilt Steffen Meier, der mir während der ganzen Zeit eine große Stütze war, indem er mich geduldig und ausdauernd motivierte und mich in schwierigen Zeiten aufmunterte. Meinem Bruder Marc möchte ich ganz herzlich für das erste Korrekturlesen danken und für seine fachliche Unterstützung bei der Anwendung von Microsoft Word und der formalen Gestaltung der Dissertation. Besonders danken möchte ich Alexander Wolinski, der mir in der Zeit der Vorbereitung zur und während der Disputation viel Rückhalt gegeben hat und mich in technischen Fragen unterstützte. Meinen Eltern Volkmar und Renate Assmann bin ich sehr dankbar für die moralische und finanzielle Unterstützung während der Promotion und des Studiums. Ohne euren Rückhalt wäre dies alles nicht möglich gewesen - danke, dass ihr für mich da seid.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6264-4



9 783835 196264

Photo cover: © iLexx - iStockPhoto